

T1220



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

HEMODİYALİZ HASTALARINDA
LEGIONELLA PNEUMOPHILA
ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

T1220 / 1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. DİLEK ER

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. TÜMER VURAL

"Tezinden kaynakça gösterilerek yararlanılabilir"

Antalya, 1997

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
AŞ

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Tarihçesi.....	2
2.2.Etkenin Tanımlaması.....	3
2.3.Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	5
2.4.Ekstrasellüler Ürünler.....	6
2.5.Legionellaceae Ekolojisi.....	6
2.6.Enfeksiyon Kaynakları.....	7
2.7.Bulaş Yolları.....	8
2.8.İnsidans.....	9
2.9.Virulans ve Patogenez.....	10
2.10.Hastalığın Kliniği.....	13
2.10.1 Lejyoner hastalığı.....	13
2.10.2 Pontiac ateşi.....	14
2.11.Laboratuvar Tanısı.....	14
2.11.1.Boyanma özellikleri.....	15
2.11.2.Kültür.....	16
2.11.3.İmmuno-fluoresan Yöntemler.....	18
2.11.3.1.Direkt Fluoresan Antikor(DFA) Yöntemi.....	18
2.11.3.2.İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) Yöntemi.....	18
2.11.3.3.DNA Probe ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	19
2.11.3.4.Üriner Antijen.....	19
2.12.Tedavi.....	19
2.13.Rezervuar Dezenfeksiyonu.....	20
2.13.1.Su sıcaklığı.....	20
2.13.2.Biocid'ler.....	21
2.13.3.Ultraviyole ışınları.....	21
3.HASTALAR VE METOD.....	23
4.BULGULAR.....	26
5.TARTIŞMA.....	30
6.SONUÇ.....	35
7.ÖZET.....	36
8.KAYNAKLAR.....	37

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İlk kez 1976 yılı Philadelphia salgını ile tanımlanan Lejyoner hastalığı ile ilgili, günümüze değin, çok sayıda epidemik ve sporadik olgular gözlenmiştir. Legionella türleri, doğada yaygın olarak bulunmakta ve su dağıtım sistemlerinde kolaylıkla kolonize olabilmektedir. DNA analiz yöntemleri ile nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında sıkça gözlenmelerine karşın, rutin laboratuvar yöntemlerinin tanımlamadaki yetersizliği, Lejyoner hastalığının prevalansını azaltmaktadır.

Hastane ortamında uzun süre bulunan hemodiyaliz hastaları nozokomiyal enfeksiyonlar için risk grubu oluşturmaktadırlar.

Sunulan araştırmada; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hemodiyaliz Ünitesi hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan serum örneklerinde, İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) yöntemi ile;

- Legionella pneumophila* antikor prevalansı,
- Hemodiyaliz süresinin, *L pneumophila* antikor prevalansı ile olan ilişkisi araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçesi

Lejyoner hastalığı, 1976 yılında, Philadelphia'daki 'Amerikan Lejyonerleri' toplantısına katılan üyelerin 182'sinde görülmüş, hızla gelişen bu pnömoni salgınında 29 kişi hayatını kaybetmiştir. (1).

1974 yılında, aynı otelde yapılan 'Oddfellow' toplantısının 11 üyesi de Lejyoner hastalığına yakalanmış , ancak bu salgın *L.pneumophila*'nın izolasyonuna kadar dikkati çekmemiştir (2).

Bilinen ilk Lejyoner hastalığı salgını, 1957 yılında Austin, Minnesota'daki bir mezbahanın işçileri arasında görülmüştür (3).

1965 yılında, Washington DC St.Elizabeth's Psikiyatri Hastanesi'ndeki pnömoni salgını sonucu 81 hastanın 14'ü hayatını kaybetmiştir. 12 yıl süre ile saklanan serum örnekleri, retrospektif olarak araştırıldığında, hastaların %85'inde *L.pneumophila* antikor serokonversiyonu saptanmıştır (4).

L.pneumophila'nın ilk izolasyonu 1947'de olmuştur. Sebebi bilinmeyen, ateşli hastalığı olan bir kişinin kanı, kobaya inoküle edilmiş, 'riketsiya benzeri' bir mikroorganizma izole edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu, 30 yıl sonra, bu mikroorganizmanın *L.pneumophila* olduğu anlaşılmıştır (5,6).

1977 yılında CDC (Hastalık Kontrol Merkezi)'den Dr. Joseph Mc Dade, atipik pnömoni nedeniyle ölen bir hastanın akciğer otopsi materyalinden, gram negatif bir bakteri izole etmiştir(7). Yeni izole edilen bu bakteri, hiçbir taksonomik gruba uymadığından yeni bir familya; *Legionellaceae* familyası, yeni bir cins; *Legionella* cinsi, yeni bir tür; *pneumophila* türü olarak sınıflandırılmıştır(8). Bakteri, hem salgından etkilenen gruba ithafen, hem de akciğerde enfeksiyon oluşturduğu için, *Legionella pneumophila* olarak adlandırılmıştır.

2.2.Etkenin Tanımlanması

Legionellaceae familyası, Proteobacteria sınıfının gamma-2 subgrubunun bir bölümüdür (9).

Garrity ve Brown; DNA zincir homolojisi ve DNA'nın guanin-sitozin içeriğine dayanarak Legionellaceae familyasının üç genusa bölünmesini önermişlerdir; Legionella (*L.pneumophila*), Fluoribacter (*F bozemanii*, *F gormanii*, *F dumoffii*), Tatlockia (*T.micdadei*, *T.maceachernii*) (10). Ancak, güncel olarak kabul edilen "**Legionella**" genusunun kullanımınıdır (9,11).

Yapılan çeşitli çalışmalarla, günümüze dek Legionellaceae familyasında 44 tür saptanmış olup, 21 türü insanlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Bu familyada yer alan, Legionella genusunun prototipi ve Lejyoner hastalığının en sık gözlenen etyolojik ajanı olan *L.pneumophila* 16 serogrup içerirken, 9 tür iki serogrup, 34 tür ise bir serogrup içermektedir (Tablo2.1). İnsanlarda gözlenen enfeksiyonların çoğundan ise *L.pneumophila* serogrup 1, 4 ve 6 sorumludur (12).

Tablo2.1: Legionella türlerinin içerdiği serogrup sayısı ve insanlarda enfeksiyon oluşturabilme özelliği.

Legionella türleri	Serogrup sayısı	Enfeksiyon oluşturma özelliği	Kaynaklar
1 <i>L adalaidensis</i>	1	Yok	Benson et al ,1991
2 <i>L anisa</i>	1	Var	Gorman et al ,1985; Harrison and Saunders,1994
3 <i>L birminghamensis</i>	1	Var	Wilkinson et al ,1987
4 <i>L bozemanii</i>	2	Var	Brenner et al ,1980; Harrison and Saunders, 1994
5 <i>L brunensis</i>	1	Yok	Wilkinson et al ,1988
6 <i>L cherrii*</i>	1	Var ^a	Brenner et al ,1985; Fang et al ,1989
7 <i>L cincinmatiensis</i>	1	Var	Thacker et al ,1988
8 <i>L dumoffii</i>	1	Var	Brenner et al ,1980
9 <i>L erythra</i>	2	Yok	Brenner et al ,1985; Harrison and Saunders, 1994
10 <i>L fairfieldensis</i>	1	Yok	Thacker et al ,1991
11 <i>L feeleii</i>	2	Var	Herwaldt et al , 1984; Harrison and Saunders, 1994
12 <i>L geestiana</i>	1	Yok	Dennis et al , 1993

Tablo2.1(Devam): Legionella türlerinin içerdiği serogrup sayısı ve insanlarda enfeksiyon oluşturabilme özelliği.

13	<i>L gormanii</i>	1	Var	Morris et al , 1980; Harrison and Saunders, 1994
14	<i>L gratiana</i>	1	Yok	Bornstein et al , 1989
15	<i>L hackeliae</i>	2	Var	Brenner et al ,1985; Harrison and Saunders, 1994
16	<i>L israelensis</i>	1	Yok	Bercovier et al , 1986
17	<i>L jamestowniensis</i>	1	Yok	Brenner et al ,1985
18	<i>L jordanis</i>	1	Var	Cherry et al , 1982; Harrison and Saunders, 1994
19	<i>L lansingensis</i>	1	Var	Thacker et al ,1992
20	<i>L londiniensis</i>	2	Yok	Dennis et al , 1993; Lo Presti et al , 1996b
21	<i>L longbeachae</i>	2	Var	McKinney et al , 1981; Harrison and Saunders, 1994
22	<i>L lytica*</i>	1	Var ^b	Drozanski,1991;Rowbotham,1993;Hookey et al.,1996
23	<i>L maceachernii</i>	1	Var	Brenner et al ,1985; Harrison and Saunders, 1994
24	<i>L micdadei</i>	1	Var	Hebert et al , 1980
25	<i>L moravica</i>	1	Yok	Wilkinson et al ,1988
26	<i>L nautarum</i>	1	Yok	Dennis et al , 1993
27	<i>L oakridgensis*</i>	1	Var ^c	Orrison et al , 1983; Fang et al , 1989
28	<i>L parisiensis</i>	1	Var	Brenner et al ,1985; Lo Presti et al , 1996a
29	<i>L pneumophila</i>	16	Var	Brenner et al ,1979, 1988; Lüch et al , 1995
30	<i>L quateirensis</i>	1	Yok	Dennis et al , 1993
31	<i>L quinlivanii</i>	2	Yok	Benson et al , 1989; Harrison and Saunders, 1994
32	<i>L rubrilucens</i>	1	Yok	Brenner et al ,1985
33	<i>L sainthelensi</i>	2	Var	Campbell et al , 1984; Harrison and Saunders, 1994
34	<i>L santicrucis</i>	1	Yok	Brenner et al ,1985
35	<i>L shakespearei</i>	1	Yok	Verma et al , 1992
36	<i>L spiritensis</i>	2	Yok	Brenner et al ,1985; Harrison and Saunders, 1994
37	<i>L steigerwaltii</i>	1	Yok	Brenner et al ,1985
38	<i>L tucsonensis</i>	1	Var	Thacker et al ,1989
39	<i>L wadsworthii</i>	1	Var	Edelstein et al , 1982a
40	<i>L walter sii</i>	1	Yok	Benson et al , 1996
41	<i>L wor sleiensis</i>	1	Yok	Dennis et al , 1993
42	<i>sp nov strain</i>	1	Yok	Lo Presti et al , 1996b
<i>Montbeliard</i>				
43	<i>sp nov strain</i>	1	Yok	Lo Presti et al , 1996b
<i>Greoux</i>				
44	<i>sp nov strain IB V</i>	1	Yok	Lo Presti et al , 1996b

*İnsanlarda enfeksiyon oluşturma özelliği; izolasyon olmaksızın, serolojik yöntemler (a,b,c), amibde zenginleştirme ve genetik yöntemler (b) ve boyama yöntemi ile (c) tanımlanmıştır.

L. pneumophila'nın, familyanın diğer türlerinden ayrımı için; Direkt Fluoresan Antikor (DFA) yöntemi, DNA hibridizasyonu, multilokus enzim elektroforezi ve çapraz immunoelektroforez gibi yöntemler kullanılmaktadır (11,13). Ayrıca, Legionellaceae familyası üyelerinin, hücre duvarında büyük miktarda ubiquinon içeren dallı zincirli yağ asitleri içermesi nedeni ile, gaz-likit kromatografisi ve hücre sel ubiquinon analizi ile öntanısı yapılabilmektedir (14-16).

2.3.Morfolojik Ve Fizyolojik Özellikleri

Legionellaceae familyası üyeleri gram negatif, aerobik, sporsuz, genellikle kapsülsüz ve hareketli, pleomorfik görünümde çomaklardır. Gram negatif olarak tanımlanmalarına karşın, Gram boyama yöntemiyle zor boyanan Legionella türleri; 0,3-0,9 µm eninde, 2-20 µm boyundadırlar. Doku ve klinik örneklerde bulunan mikroorganizmalar, 1-2 µm'lik kokobasil görünümünde olmalarına karşın, besiyerinde üremiş Legionella türleri uzun, filamentöz formlarda görülebilirler (12).

Legionella türleri, hücre sel yağ asitlerinin %80'den fazlasının dallı zincirli olması nedeni ile, gram negatif bakteriler arasında ayrıcalıklıdır. Bu özellikleri ile Corynebacterium cinsi gibi gram pozitif bakterilere ve mikolik asit gibi uzun karbon zinciri içeren Mycobacterium cinsine yakın benzerlik göstermektedirler (6).

Legionellaceae familyası üyeleri, katalaz enzimi içermesine karşın, bu reaksiyon diğer bakterilere göre daha zayıftır. Legionella türlerinin, üreaz, nitrat redüksiyonu ve fermentasyon aktivitesi negatiftir. *L. pneumophila* oksidaz olumsuz, jelatinaz ve hippurat hidrolizi olumludur, ancak Legionellaceae familyasının diğer türlerinde bu özellikler değişkendir (12).

Primer izolasyonda *L. oakridgensis* haricinde diğer türler tek polar flagella ve çok sayıda fimbria içermesine karşın, flagellanın varlığı sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (6). Legionellaceae familyasındaki türler, içte ve dışta

trilaminer membran, peptidoglikan tabaka ve bazı türlerde polisakkarit yapıda bir kapsül içermektedir (12).

L.pneumophila 24.000 - 29.000 molekül ağırlığında majör dış membran proteini (MOMP- major outer membrane protein) içermektedir (18,19). Peptidoglikan tabaka ile ilişkili olan bu protein, iyon-permeabl kanallar oluşturan bir porindir (20). *L.pneumophila* serogrup 1'in lipopolisakkarit yapısı bu proteine bağlanmıştır. Organizmada lipopolisakkarit yapıya karşı oluşan antikorlar IFA yöntemi ile saptanabilmektedir (21).

Familiya üyeleri, enerjilerini, Krebs siklusu yoluyla katabolize edilen aminoasitlerden, şekerleri ise pentoz siklusu ve Embden-Meyerhof yolundaki glikoneojenik enzimler ile sentezlerler (12).

2.4.Ekstrasellüler Ürünler

Legionella türleri; hemolizinler, proteazlar, esterazlar, fosfotazlar, aminopeptidazlar ve endonükleazlar gibi enzimler ve potansiyel toksinler üretirler (22-28). Majör sekretuar bir protein olan 38 kDa metalloproteaz, hemolitik ve sitotoksik özellikler içermektedir (29-31).

2.5.Legionellaceae Ekolojisi

Legionellaceae familyasındaki türlerin ekolojilerinin bilinmesi, potansiyel salgınların önlenmesi amacıyla gereklidir. Türlerin doğal kaynakları nehirler, göller, termal sular ve nemli kazı toprağıdır. *L.pneumophila*, sıcaklığı 0-63 °C, pH'sı 5.0-8.5 ve çözünmüş oksijen içeriği 0,2-15.0 mg/l arasında değişebilen, geniş bir fiziksel spektrum içerisinde yıllarca canlı kalabilir (12).

Legionella türlerinin, doğada yaşamını sürdürebilmesi ve çoğalabilmesi için, ortamda bazı mikroorganizmaların bulunması önemlidir. Siyanobakteriler ve diğer Legionella dışı bakteriler, Legionella türlerinin in vitro koşullarda üremesini stimüle ederler (32,33). Sularda serbest olarak yaşayan amipler ve silli protozoalar, enfeksiyon kaynağı olarak şüphelenilen ortamlardan,

Legionella türleri ile birlikte izole edilmişlerdir (34). Mavi-yeşil algler, amip ve silli protozoaları enfekte ederek çoğalabilen mikroorganizma, uygun olmayan çevre koşullarında yaşamını sürdürebilir (12).

Legionella türleri, doğal su ortamlarında az sayıda bulunması nedeni ile, düşük oranlarda su dağıtım sistemlerine geçerler. Ancak, su dağıtım sistemlerinde, suyun durgun olduğu alanlar gibi uygun üreme ortamları bulunması ve klora yüksek oranda dirençli olmaları nedeni ile, canlılıklarını sürdürmeye ve çoğalmaya devam ederler. Soğutma kuleleri, su dağıtım sistemleri, su depoları gibi fiziksel korunma ve besin sağlayan, su sıcaklığı uygun olan, insan yapımı sistemlerde hızla çoğalırlar (35-37).

Legionella türlerinin su sistemlerindeki kolonizasyonu; su sıcaklığı, sediment birikimi ve kommensal mikroflora gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (38). Dip sedimentinin yüzeyinde bulunan legionellalar için, özellikle sıcaklık, önemli bir parametredir. Su tanklarının dip sedimentinde bulunan ortam bakterileri, Legionella türleri için gerekli temel besinleri sağlayarak yaşamalarını destekler (39-43).

Yapılan çalışmalarda; Legionella türleri ile kolonize olmuş sıcak su depolarının, özellikle vertikal tipte ve eski olduğu, suyun yüksek konsantrasyonda Ca^{+2} ve Mg^{+2} içerdiği saptanmıştır. Aynı zamanda, vertikal tipte olan su depolarının dip kısmında, kolonizasyonu kolaylaştıran ve farklı sıcaklık katmanlarında olan daha kalın bir dip sedimentinin olduğu görülmüştür (41,44).

2.6.Enfeksiyon Kaynakları

Su dağıtım sistemleri, Legionella türlerinin yayılımı açısından primer kaynaklardır (45,46). Yapılan çeşitli çalışmalarda; nozokomiyal olguların, hastane su dağıtım sistemlerinin kontaminasyonu ile, toplumsal kaynaklı olguların ise, endüstriyel bölgeler ve yerleşim bölgelerindeki su kaynaklarının kontaminasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (47-50).

Legionella türlerinin en çok çok bulunduğu ve amplifiye olduğu alanlar şunlardır;

- soğutma kuleleri ve klima cihazlarının suyu,
- sıcak ve soğuk su sistemleri,
- su tankları,
- evaporatör ve nebulizörler,
- duş başlıkları ve sıcak su muslukları,
- hastanelerde bulunan solunum terapi ekipmanları,
- termal banyolar, çamurlar ve kaplıcalardır.

Ayrıca oda nemlendiricilerinin de, *L. pneumophila* içeren aerosoller yaydığı saptanmıştır (51).

Enfeksiyon kaynağının saptanması ve doğrulanması amacıyla; moleküler fingerprinting metodları, elektroforetik alloenzim tipleme, ribotipleme, DNA'nın pulse alan elektroforezi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve monoklonal antikor panelleri kullanılmaktadır (52-60).

2.7.Bulaş Yolları

L. pneumophila'nın yayılım modu kesin değildir. Hava yolu ile yayılma üstün gelen tezdır, ancak aspirasyon veya solunum yolları manüplasyonları sırasında, kontamine suyun direkt alımı ile de geçebilmektedir.(61)

Aerosolizasyonun en kuvvetli kanıtı, 1968 Pontiac ateşi salgınında gözlenmiştir. Salgında evaporatif kondansatörlerin oluşturduğu aerosollerin havalandırma sistemi kontaminasyonunda rolü olabileceği düşünülmüş, binadaki kobaylardan da, salgından sorumlu *L. pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir (62). Bakterinin, soğutma kulesi kaynaklı aerosoller içerisinde hava akımları ile 1,6 km'den fazla taşınabildiği bildirilmiştir (63).

Kontamine musluk suyu ile doldurulmuş veya yıkanmış nebulizer gibi solunum sistemi ekipmanları, aerosolizasyon ile bulaşa yol açabilmektedir (64). Yapılan bir araştırmada, *L. pneumophila* içeren duş başlıkları ve sıcak su

musluklarının, az sayıda mikroorganizmayı aerosolleştirebildiği, ancak aerosol partiküllerinin alt solunum yollarına penetre olabilecek kadar küçük (1-5 µm) olduğu bildirilmiştir (65).

Kontamine sular veya kolonize orofaringeal sekresyonların aspirasyonu da olası bulaş yollarından biridir. Özellikle, baş-boyun kanseri nedeni ile opere olmuş hastalarda aspirasyona eğiliminin artması, nozokomiyal Lejyoner hastalığı insidansını yükseltmektedir (66).

Kontamine sularla temasa bağlı yara enfeksiyonları, hemodiyaliz fistül enfeksiyonları ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları da bildirilmiştir (67,51).

2.8.İnsidans

Lejyoner hastalığının insidansı; su rezervuarlarının mikroorganizma ile kontaminasyon derecesine, kontamine su ile temas eden kişinin duyarlılığına ve etkenin organizmaya giriş konsantrasyonuna bağlıdır. Ancak enfeksiyonun saptanabilmesinde, özelleşmiş laboratuvar testlerinin varlığı da önemlidir. Laboratuvar tanı yöntemlerinin yetersizliği nedeni ile, Legionella enfeksiyonlarının bilinenden çok daha fazla olabileceği belirtilmektedir (12,67).

Yapılan çalışmalar ile, toplumsal kaynaklı pnömonilerde Legionella türlerinin en sık gözlenen üç etken arasında olduğu saptanmıştır (68-74).

Nozokomiyal pnömoni insidansı; mikroorganizmanın kolonizasyon derecesine, immunsuprese hasta sayısına ve enfeksiyonu saptayacak tanı yöntemlerinin yeterliliğine bağlıdır (56,75-77).

Sigara kullanımı, kronik akciğer hastalığı, ilerlemiş yaş ve immun supresyon başlıca risk faktörleridir. Bazı çalışmalarda aşırı alkol alımı ve böbrek yetmezliği de risk faktörü olarak bildirilmiştir (12,78). İmmunsuprese ve alta yatan akciğer hastalığı olan çocuklar ile yenidoğanlarda, nozokomiyal enfeksiyon olguları bildirilmiştir (79,80). AIDS hastalarında da, Legionella türleri ile oluşan enfeksiyon olgu sayısının arttığı gözlenmektedir. Bu hastalar ekstrapulmoner enfeksiyonlar, bakteremi ve akciğer absesine eğilimlidirler (12).

2.9. Virulans ve Patogenez

L.pneumophila, toplumdan kazanılmış diğer pnömoni etkenlerine göre, daha ciddi bir hastalığa neden olmaktadır (81,82). Bazı Legionella türleri ve serotiplerinin insan enfeksiyonlarında daha sık gözlenmesi, henüz açıkça tanımlanamamış olan virülans faktörlerinin varlığını düşündürmektedir. Örneğin, *L.pneumophila* serogruplarının çoğu, su dağıtım sistemlerinde kolonize olabilmesine karşın, genellikle sadece birkaç serogrubu hastalık oluşturabilmektedir (53,83-85).

Legionella türlerinin insan enfeksiyonlarındaki patojenitesi, konak hücreleri invaze edebilme yeteneğine bağlıdır. Solunum yoluyla alınan mikroorganizma, solunum yolları epitel hücrelerine adhere olarak mukosilyer temizleme işleminden kurtulur (86,87). Bu nedenle, sigara kullanan, alkolik veya kronik akciğer hastalığı olan kişilerde enfeksiyon riski yüksektir (12).

Mikroorganizma alveole ulaştıktan sonraki tablo, hem bakterinin virulansına hem de konağın savunma yeteneğine bağlıdır. Konak defansındaki primer komponent, alveoler makrofajlardır. Alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen *L.pneumophila*, ribozom ile ilişkili, özelleşmiş bir fagozom ile kuşatılır. Ancak mikroorganizmayı kuşatan fagozom, lizozom ile füzyon yapamadığından, mikroorganizma lizozomların mikrobisidal etkisinden kurtulur ve makrofaj rüptüre olana dek çoğalır. Hücre rüptüre olduktan sonra ortamdaki bakteriler, yeni hücreler tarafından fagosite edilir ve siklus yeniden başlar (88-90).

İn vitro koşullarda, *L.pneumophila*, oksijene bağımlı mikrobisidal sistemlere duyarlı olmasına karşın, polimorfonükleer lökositler mikroorganizmanın öldürülmesinde yeterince etkili değildir. *L.pneumophila* nötrofiller tarafından, sadece, spesifik antikor veya kompleman varlığında fagosite edilebilir. Mikroorganizma, monositlerin aksine, polimorfonükleer lökositlerde yeterince replike olamaz (91).

İn vitro çalışmalar, konak savunmasında, humoral bağışıklığın, sekonder bir rol oynadığını göstermiştir. Örneğin, oluşan antikorlar mikroorganizmanın;

- kompleman aracılığı ile öldürülmesini arttıramaz,
- monositler ve alveoler makrofajlardaki çoğalmasını inhibe edemez,
- sadece fagositler tarafından öldürülmesini ılımlı bir şekilde arttırabilir (88).

Türe özgü olan bu antikorlar, enfeksiyondan sonraki ilk birkaç hafta içerisinde saptanabilir (92,93).

Diğer intrasellüler patojenler gibi, *L pneumophila*'ya karşı primer konak defansı, hücresel bağışıklık aracılığı ile gerçekleştirilir. Lejyoner hastalığı; AIDS hastaları, kortikosteroid alan hastalar, transplant hastaları ve hairy cell lösemili hastalar gibi hücresel bağışıklığı deprese hastalar için daha yaygın ve ciddi bir enfeksiyondur (12).

Mononükleer hücreler, *L pneumophila* antijenlerine karşı hem proliferasyon hem de IFN- γ (94-96), IL-1 (97), TNF (94,98,99) gibi, monositleri aktive eden sitokinlerin üretimiyle yanıt verir. Monositler tarafından aktive edilen IFN- γ , mikroorganizma için gerekli olan Fe'i sınırlayarak, *L pneumophila*'nın intrasellüler çoğalmasını inhibe eder (100). Yine, IL-2 tarafından aktive edilen Naturel Killer'ların, *L pneumophila* ile enfekte mononükleer hücreleri öldürdüğü gösterilmiştir (101).

İn vitro çalışmalarda, *L pneumophila*'nın, fagositik hücrelerce üretilen süperoksit ve hidrosit radikalleri gibi çeşitli reaktif oksijen ara ürünlerine ve hidrojen peroksite duyarlı olduğu bulunmuştur (6).

L pneumophila, komplemanı hem klasik hem de alternatif yoldan aktive edebilmektedir. Ancak alternatif yoldan aktivasyonda, C₃b, bakterinin lipopolisakkarit yapısı yerine, dış membran porin proteinine bağlanmaktadır. Bu porin proteini, hem virulan hem de avirulan suşlarda bulunabildiği için virülansdaki rolü tartışmalıdır. Ancak pasajlarla avirulan hale getirilmiş virulan suşlarda, porin düzeylerinde belirgin azalma olduğu gözlenmiştir (102-105).

Antikorlar veya C₃b ile opsonizasyon, *L.pneumophila*'nın fagositozunu arttırmaktadır. Ancak opsonizasyonun olmadığı durumlarda da, 'Mip' (macrophage infectivity potentiator) olarak tanımlanmış olan 24 kDa'luk dış membran proteini, bakterinin makrofaj içerisine girmesini sağlamaktadır. *L.pneumophila*'da mip geni delesyonunun, in vitro koşullarda bakterinin insan makrofajlarını invaze etme yeteneğini azalttığı gözlenmiştir. Mip, *L.pneumophila*'ya özgü bir protein olarak tanımlanmış olmasına karşın, diğer Legionella türlerinde, 24-30 kDa'luk Mip benzeri bir protein olduğu saptanmıştır (105-109).

Yapılan çalışmalarda, *L.pneumophila* Philadelphia 1 (*L.pneumophila* Ph1) suşunun, opsonizan faktörlerin yokluğuna karşın, 'coiling phagocytosis' olarak adlandırılan farklı bir fagositik 'uptake' formunu provoke ettiği gözlenmiştir. Bu olayda, makrofaj önce uzun ince bir psödopod oluşturmakta ve bakteri psödopod tarafından sarmalanarak bir vezikül içerisine alınmaktadır. Oluşan fagozom, sırasıyla, konak hücrenin düz endoplazmik retikulum vezikülleri, mitokondri ve ribozomları ile interaksiyona girerken, lizozom ile füzyon gerçekleşmemektedir. Avirulan suş (*L.pneumophila* mutant 25D) fagosite edildiğinde ise, fagozom lizozim füzyonu olduğu halde, fagozomun diğer organellerle ilişkiye girmediği gözlenmiştir. Virulan suş, ribozomlarla çevrili fagozom içerisinde çoğalabilirken, mutant suş çoğalamamaktadır (110,111). Başka bir çalışma da ise, *L.pneumophila* Ph 1 suşunun fagozomun asidifikasyonunu önlediği gösterilmiştir (112,113). Sonuç olarak, hem fagolizozomal füzyonun inhibe edilmesi, hem de vezikülün asidifiye edilemeyişi nedeniyle, mikroorganizma intrasellüler varlığını sürdürebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, Legionella türlerinin ürettiği toksin ile proteazlar ve hemolizinler gibi ekstrasellüler maddelerin, mikroorganizmanın intrasellüler devamlılığından ve bazı klinik tablolardan sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Toksinin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın,

nötrofil aktivasyonunun erken basamaklarında sinyal iletiminde görevli olduğu, O₂⁻ ve diğer oksijen radikallerinin üretimini inhibe ettiği saptanmıştır (114).

Çalışmalar; *L.micdadei* dışında, özellikle *L.pneumophila* olmak üzere çoğu Legionella türünün, üremeleri sırasında ortama, fosfolipaz C sekrete ettiklerini göstermiştir. Fosfolipaz C'nin substratı olan fosfotidil kolin, ökaryotik membranlarda bol miktarda bulunur ve aynı zamanda pulmoner surfaktanın majör komponentidir. Fosfotidil kolin'in parçalanması ile hem alveoler düzeyde gaz değişiminin inhibe olduğu hem de fagositler ve akciğer dokusunda patolojik değişiklikler olabileceği anlaşılmıştır (115,116).

Özellikle, *L.pneumophila*'dan izole edilen 38 kDa'luk çinko metalloproteazın hemolizin aktivitesi olup, hastalığı geçiren bireylerin serumlarında antikor titrelerinin arttığı saptanmıştır (105,117). Metalloproteaz, aynı zamanda CD-4 ve IL-2 reseptörlerini enzimatik yolla inaktive ederek, T helper aktivasyonunu inhibe etmektedir (118).

2.10.Hastalığın Kliniği

L.pneumophila iki farklı hastalığa neden olur. Bunlardan birisi Lejyoner hastalığı adı verilen akut bir solunum yolu hastalığı, diğeri ise Pontiac ateşi olarak bilinen nonpnömonik bir hastalıktır.

2.10.1.Lejyoner Hastalığı:

Lejyoner hastalığının başlıca klinik bulgusu pnömonidir. Hastalık, ılımlı bir öksürük ve hafif ateşden, yaygın pulmoner infiltrasyon ve multisistem yetmezlik ile birlikte olan stupora dek geniş bir spektrum içerir. Enkübasyon periyodu 2-10 gündür. Hastalığın başlangıç döneminde, ateş, miyalji, üşüme-titrete, iştahsızlık, başağrısı gibi nonspesifik semptomlar gözlenir.

Olguların, %25-50'sinde sulu diare, %10-20'sinde bulantı-kusma ve karın ağrısı görülebilir. Mental durum değişikliği ise, en yaygın gözlenen nörolojik bozukluktur (74,76,119,120).

Klinik görünümü nonspesifik olmasına karşın, tanı konulamamış pnömoni vakalarında, aşağıda belirtilen özellikler Lejyoner hastalığı olasılığını artırır;

- Respiratuar sekresyonların Gram boyamasında çok sayıda nötrofil bulunmasına karşın, az sayıda ya da hiç mikroorganizma görülmemesi,
- Hiponatremi (serum Na⁺ düzeyi 130 mEq/lit'nin altında) olması,
- Beta laktam (penisilin veya sefalosporin) ve aminoglikozid antibiyotiklere yanıtta yetersizlik olması,
- Legionella türleri ile kontamine olduğu saptanan, hastane veya çevresel içme suyu kaynağının varlığıdır (12).

Pnömoni dışında, immunsuprese hastalarda, sellülit, sinüzit, perirektal abse, perikardit, pyelonefrit, pankreatit ve endokardit gibi ekstrapulmoner tutulumlar tanımlanmıştır (121-123). Yayılım bakteremi ile meydana gelmektedir. Yaraların, kontamine sular ile yıkanmasından sonra oluşan yara enfeksiyonları ve Legionella prostetik kapak endokarditi olgu sunumu olarak bildirilmiştir (124-125).

DIC, trombositopeni, glomerulonefrit, rabdomiyoliz, çeşitli döküntüler, nöropatiler ve hepatik yetmezlik gibi çeşitli klinik tablolar da gözlenmiştir (12).

2.10.2.Pontiac ateşi:

24-48 saatlik enkübasyon periyodunu takiben başlayan, akut, kendi içinde sınırlı, soğuk algınlığı benzeri, nonpnömonik bir hastalıktır. Başlıca semptomlar ateş, üşüme-titreme, miyalji ve baş ağrısıdır. Nonproduktif öksürük, baş dönmesi, kusma da klinik tabloya iştirak edebilir. Sadece semptomatik tedavi ile bir hafta içerisinde tam iyileşme gözlenir (12).

2.11.Laboratuvar Tanısı

Lejyoner hastalığının klinik ve radyolojik bulguları spesifik olmadığı için, tanı koyabilmek amacıyla özel tanı yöntemlerine gereksinim vardır. Bunlar

arasında güncel olanlar; özel selektif besiyerlerine kültür yöntemi, monoklonal antikor işaretli DFA, solid faz radioimmunoassay (SPRIA), PCR, üriner antijen, DNA hibridizasyonu, IFA, enzimimmünassay (ELISA) ve hızlı mikroaglutinasyon gibi yöntemler; gerek çevresel gerekse klinik örneklerde Legionella türlerine ait antijen veya türlere karşı oluşan antikorları saptayabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda kültür, direkt immunofluoresan ve üriner antijen arama gibi yöntemler daha sıklıkla kullanılmaktadır (51).

2.11.1. Boyanma özellikleri:

Klinik örneklerdeki mikroorganizma standart Gram boyama yöntemi ile iyi boyanamadığı için, zıt boya olan Safranin'i daha uzun süre uygulamak (örneğin 2 dakika) gibi modifiye yöntemler kullanılabilir (6).

Gimenez boyası, Gram boyama yöntemine göre mikroorganizmayı daha etkili boyamaktadır (12).

Parafin ile fikse dokulardaki mikroorganizmanın gözlenebilmesi için, Warthin-Starry ve Dieterle gibi gümüş boyaları kullanılmaktadır (12,126).

Besiyerine pasajı yapılan bakteriler, hem klinik örneklerde bulunanlardan daha kolay boyanır, hem de filamantöz ve basil formlarının birarada gözleendiği pleomorfik bir yapı gösterir. Türlerin çoğunda, Sudan Black B ile boyandığında siyah renkte görünen, lipid içeren vakuoller bulunur (6).

L. micdadei, *L. bozemanii* ve *L. dumoffi*'nin doku örneklerinde zayıf asid-fast olarak boyandığı, ancak besiyerine pasajlandıktan sonra bu özelliklerini kaybettikleri bildirilmiştir (6). Bu yöntemde, renksizleştirme işleminde %1'lik Sülfürik asit kullanılmaktadır. Bu özellik, *L. micdadei* enfeksiyonlarının yanlışlıkla mikobakteriyel enfeksiyon olarak yorumlanmasına ve tedavide antitüberküloz ajanların kullanımına neden olabilmektedir (12).

2.11.2.Kültür

Legionella türleri ile oluşan enfeksiyonların tanısı için doğrulayıcı yöntem, örneklerden, mikroorganizmanın izolasyonudur (12).

Legionella türleri standart besiyerlerinde üretilmediğinden; üreme faktörleri, boyalar ve değişik antibiyotik kombinasyonları içeren selektif besiyerleri kullanılır (Tablo2.2).

Legionella türleri ile oluşan nadir enfeksiyonlar dışında, genellikle hastanın, balgam, endotrakeal veya transtrakeal aspirasyon mayii, bronkoalveoler lavaj sıvısı ve akciğer biopsi materyali gibi solunum sistemine ait klinik örneklerin, özel işlemlerden sonra kültürleri yapılmaktadır (51).

İzolasyon için kullanılan primer besiyeri, pH'ı 6.9'a tamponlanmış charcoal yeast extract (BCYE- α) agardır. Besiyerindeki ketoasitler ve Fe iyonları ile birlikte büyümeyi stimüle eden L-sistein, önemli bir maddedir. Yeast extract'daki aktif maddeler, en önemlisi Guanin olmak üzere pürin ve primidin deriveleridir (12). Özellikle ışığa maruz kaldıktan sonra, besiyerinde süperoksid radikaller ve peroksitler gibi bileşikler oluşur. Aktive charcoal, bu bileşikleri inaktive ederek besiyerini detoksifiye eder, yüzey gerilimini düzenler ve mikroorganizmanın üremesini kolaylaştırır (127). Besiyerindeki α -ketoglutarat da mikroorganizmanın üremesine katkıda bulunur (12).

Legionella türlerinin doku, plevral sıvılar veya transtrakeal aspiratlar gibi klinik örneklerden izolasyonu için tercih edilen besiyeri; BCYE- α agardır (6).

Balgam gibi normal flora içeren diğer örneklerin kültürü için, BCYE- α agar'a Cefamandole, Polimiksin ve Anizomisin ilavesiyle geliştirilen selektif BCYE- α besiyeri kullanılır (6).

Tablo2.2: Legionella türleri için selektif izolasyon besiyerleri.

Besiyerleri	İlave edilen antibiyotikler	Kaynaklar
CYE	polymyxin B (40000 IU/l), vancomycin (0.5 mg/l),	Edelstein and Finegold, 1979
Kanlı agar + L-cysteine, Fe4(P2O7)3	amphotericin B(2.5 mg/l), colistin (15000 IU/l), trimethoprim (2.5 mg/l), vancomycin (5 mg/l),	Greaves, 1980
BCYE α	anisomycin (80 mg/l), cefamandole (4 mg/l), polymyxin B (80000 IU/l),	Edelstein, 1981
CYE	cephalotin (4 mg/l), colistin (16 mg/l), cycloheximide (80 mg/l), vancomycin (0.5 mg/l),	Bopp <i>et al.</i> , 1981
BCYE	glycine (3 g/l), polymyxin B (100000 IU/l), vancomycin (5 mg/l),	Wadowsky and Yee, 1981
BCYE α + bromcresol moru, bromthymol mavisi	anisomycin (80 mg/l), glycine (3 g/l), polymyxin B (50000 IU/l), vancomycin (1 mg/l),	Edelstein, 1982
GVP	amphotericin (80 mg/l), glycine (3 g/l), polymyxin B (100000 IU/l), vancomycin (5 mg/l),	Okuda <i>et al.</i> , 1984
BCYE α	cycloheximide (80 mg/l), glycine (3 g/l), polymyxin B (100000 IU/l), vancomycin (5 mg/l),	Dennis <i>et al.</i> , 1984a

Ekim yapılan besiyerleri, 35-37°C'de, nemli ve %5-10 CO₂'li ortamda enkübe edilir. Legionella türlerine ait koloniler, 3-4 gün içerisinde makroskobik olarak gözlenebilmesine karşın, üreme gözlenmeyen besiyerleri onuncu güne dek enkübe edilir. Oluşan koloniler, S tipinde, 3-4 mm çapında, buzlu cam görünümünde, gri-beyazdan mavi-yeşile değişebilen renklerde gözlenirler (127).

2.11.3. İmmuno-Fluoresan Yöntemler

İmmuno-fluoresan yöntemlerde; Rhodamine B isothiocyanate, Lissamine rhodamine B veya fluorescein isothiocyanate gibi fluoresan boyalar ile tavşan immunglobulini gibi antikorlar özel bir yöntem ile birleştirilmiştir (51).

Legionella enfeksiyonlarının tanısında; immuno-fluoresan yöntemlerden antijen aramaya yönelik DFA yöntemi ile, antikor aramaya yönelik IFA yöntemi kullanılmaktadır (51).

2.11.3.1. Direkt Fluoresan Antikor (DFA) Yöntemi:

Hızlı sonuç verebilmesine karşın, DFA yönteminin duyarlılığı, kültür yönteminin duyarlılığından daha düşüktür. Bunun nedeni, mikroorganizmayı saptayabilmek için, örneğin her ml'te 10^4 - 10^5 bakteri bulunması gerekmektedir (127).

Yöntemin duyarlılığı, balgam incelendiğinde yaklaşık %50 iken, bronkoalveoler lavaj, akciğer dokusu biopsi örneği gibi daha spesifik örnekler incelendiğinde %70'e ulaşmaktadır (6). Yöntemin özgüllüğü, %98-99 olarak bildirilmesine karşın; poliklonal DFA konjugatları ile *P.fluorescens*, *P.aeruginosa* ve *B.fragilis*'in nadir suşları arasındaki çapraz reaksiyonlar ve kontamine musluk suyu ile hazırlanmış DFA reagenlerine bağlı yalancı pozitif reaksiyonlar bildirilmiştir. Ancak, monoklonal antikorlar kullanılarak çapraz reaksiyon olasılığı elimine edilebilmektedir (6).

2.11.3.2. İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) Yöntemi:

IFA yöntemi Legionella enfeksiyonlarında geç tanı alınması nedeni ile, daha çok epidemiyolojik çalışmalarda ve potansiyel salgınları önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Tek bir serum örneğinde, 1/256 ve üzerindeki antikor titresinin varlığı geçirilmiş enfeksiyonu, akut ve konvelesan faz serum

örnekleri arasında, en az 1/128 olacak şekilde 4 katlık titre artışı akut infeksiyonu düşündürmektedir(12).

2.11.3.3. DNA Probe ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

DNA probe ve PCR yöntemi, ilk olarak su örneklerindeki Legionella türlerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (128,129). Legionella genusu için 5S rRNA gen dizisinin; *L. pneumophila* türleri için ise mip gen dizisinin kullanımı, *L. pneumophila*'nın diğer Legionella türlerinden ayırımını sağlamıştır (129).

Yapılan son çalışmalar, su örneklerindeki Legionella türlerinin PCR ile saptanmasının, kültür ve immunofluoresan yöntemlerden daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir (130,131). Buna karşın, suyun kirliliği gibi bazı faktörler, PCR sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir (132).

Çeşitli çalışmalarda, respiratuar örneklerdeki mikroorganizmanın saptanması amacıyla da PCR kullanılmış; duyarlılığı %85, özgüllüğü %99 bulunmuştur (133,134). Ayrıca PCR yöntemi, bakterinin idrar örneklerinde saptanması amacıyla da kullanılabilir (135).

2.11.3.4. Üriner Antijen:

Legionella antijenleri idrarda solubl halde bulunabildiği için, klinik semptomların başlangıcından yaklaşık üç gün sonra, hastanın idrarında *L. pneumophila* serogrup 1'e ait antijen radio immunoassay (RIA) veya ELISA yöntemiyle saptanabilir. Yöntemin duyarlılığı %80, özgüllüğü %100'dür (12).

2.12. Tedavi

Lejyoner hastalığının tedavisinde, eritromisin genellikle ilk seçilen antibiyotik olmasına karşın, özellikle son yıllarda azitromisin, klaritromisin ve roksitromisin gibi daha yeni makrolidler ve siprofloksasin, trovafloksasin ve pefloksasin gibi kinolonlar kullanılmaktadır. Farmakokinetik özellikleri

geliştirilen bu yeni antibiyotikler, eritromisin ile karşılaştırıldığında, in vitro olarak daha fazla aktiviteye sahiptir (12,136-139).

Eritromisin için önerilen doz; 2 gr/ gün/ PO veya 4 gr/ gün/ IV 'dür. Yüksek dozda (4gr'lık doz) gözlemlendiği bildirilen ototoksitenin, reversibl olduğu ve doz azaltıldığında veya ilaç kesildiğinde gerilediği bildirilmiştir. Gelişebilecek gastrointestinal yan etkileri de önlemek için tedaviye paranteral başlayıp, 3-5 gün içerisinde klinik yanıt gözlemlendiğinde, oral tedaviye geçilmesi önerilmektedir (12).

Legionella türlerinin çoğunluğu β -laktamaz enzimi üretmektedir. Hücre kültürü yöntemleri ile, makrolidler, kinolonlar, rifampin, trimetoprim-sulfametoksazol ve tetrasiklinlerin, in vivo koşullarda , Legionella türlerine etkili olduğu saptanmıştır. Bu antibiyotiklerin, fagositik hücrelere mükemmel penetrasyonu, klinik olarak β -laktam ve aminoglikozid ajanlara üstünlüğünü göstermektedir (12).

Kontrollü çalışmalar olmamasına karşın, Lejyoner hastalığı olduğu düşünülen olguların başlangıç tedavisinde makrolid veya kinolon ile rifampin kombinasyonu önerilmektedir (139).

Kinolon grubu antibiyotikler, makrolidler ve rifampin gibi karaciğerde metabolize olmadığı için, siklosporin gibi antirejeksiyon ilaçların metabolizması ile etkileşmez. Bu nedenle, özellikle organ transplant hastalarındaki Legionellozis tedavisinde tercih edilebilirler (6).

2.13.Rezervuar Dezenfeksiyonu

2.13.1. Su sıcaklığı:

Su dağıtım sistemlerinden Legionella türlerinin eradikasyonu için genellikle kullanılan yöntem, sistemdeki suyun belirli bir süre, 60-85°C'lerde ısıtılmasıdır. Bu yöntem geçici olup, mikroorganizmanın sistemlere tekrar kontaminasyonunu önleyemez. Bakterinin, su sistemlerinde çoğalmasını önlemek için, su sıcaklığı; soğuk su sistemlerinde 20°C'nin altında, sıcak su

sistemlerinde ise, depoda 60°C'nin üzerinde, çıkış yerlerinde 50°C'nin üzerinde sabit olarak tutulmalıdır (141).

2.13.2. Biocid'ler:

Su dağıtım ve soğutma sistemlerinde, serbest klor düzeyi belirli aralıklarla 1000 ppm ve günlük doz 1-5 ppm olacak şekilde suyun klorlanması sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasına karşın, bazı dezavantajları vardır. Klor; toksik ve koroziv bir maddedir ve sıcak suyun dezenfeksiyonu amacıyla kullanımı güçtür (142-144).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, Legionella türlerine karşı klorlu fenolik thioeter etkili bulunurken, glutraldehit ve quaterner amonyum bileşikleri etkisiz bulunmuştur (145-147). Bromo-nitropropone-diol, bromo-chloro-dimethylhydantoin ve isothiazolinon'lar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise çelişkilidir (145,146,148,149).

Ozon'un çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği araştırılmış, Legionella türleri, Ozon'a karşı E.coli, Poliovirus ve HAV'dan daha dirençli, B.subtilis sporlarından daha duyarlı bulunmuştur (150).

Bakır-gümüş iyonizasyon üniteleri (LiquiTech, Burr Ridge gibi) ürettiği iyonlar aracılığı ile, bakteri hücre duvarını parçalayarak, hücre lizisine yol açarlar. Bu üniteler su dağıtım sistemleri boyunca mikroorganizmanın tekrar kolonizasyon olasılığını azaltır (151). Yapılan kontrollü çalışmalarda yöntemin, *L pneumophila*'nın eradikasyonunda yüksek derecede etkili olmasına karşın, sistemin maliyetinin yüksek oluşu ve atık gümüşün tekrar değerlendirilememesi nedeni ile kullanımı kısıtlıdır (152).

2.13.3 Ultraviyole ışınları:

Bakterinin DNA'sını parçalayarak ölümüne neden olur. Transplantasyon veya yoğun bakım üniteleri gibi lokalize bir alanın dezenfeksiyonunda etkinliği kanıtlanmıştır (153-155). Rezidüel koruma sağlamadığı için, düzenlemeden

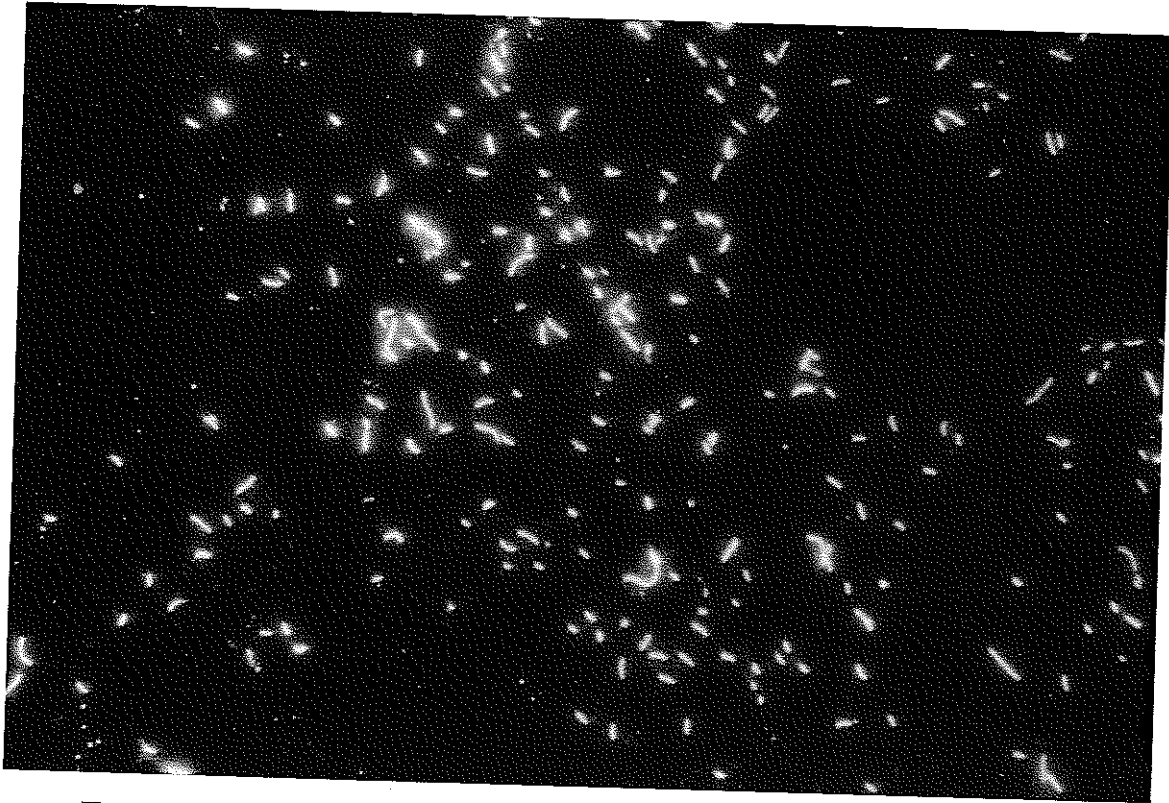
sonra distal alanlar, aşırı ısıtma veya flushing yöntemi ile dezenfekte edilmelidir.

Gerektiğinde UV radyasyonu, klorizasyon veya bakır-gümüş iyonizasyon yöntemleri birarada da kullanılabilir.

3. HASTALAR VE METOD

L.pneumophila antikor prevalansını araştırdığımız çalışmamızda, hemodiyaliz hastalarına ait 122 serum rneęi incelenmiştir. Serum rneklerinin 70'i Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 52'si ise Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hemodiyaliz nitesi'nden temin edilmiştir. Kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerden alınan 86 serum rneęi incelenmiştir.

L.pneumophila antikorları, IFA yöntemi (Mardx /30-7180) ile araştırılmıştır. IFA yönteminde antijen olarak, *L.pneumophila* serogrup 1-6, konjugat olarak fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli antihuman globulin kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *L.pneumophila* serogrup 1'e spesifik antikor içeren liyofilize maymun serumu, negatif kontrol olarak ise *L.pneumophila*'ya özgü antikor içermeyen liyofilize maymun serumu kullanılmıştır (Fotoğraf 1, Fotoğraf 2).



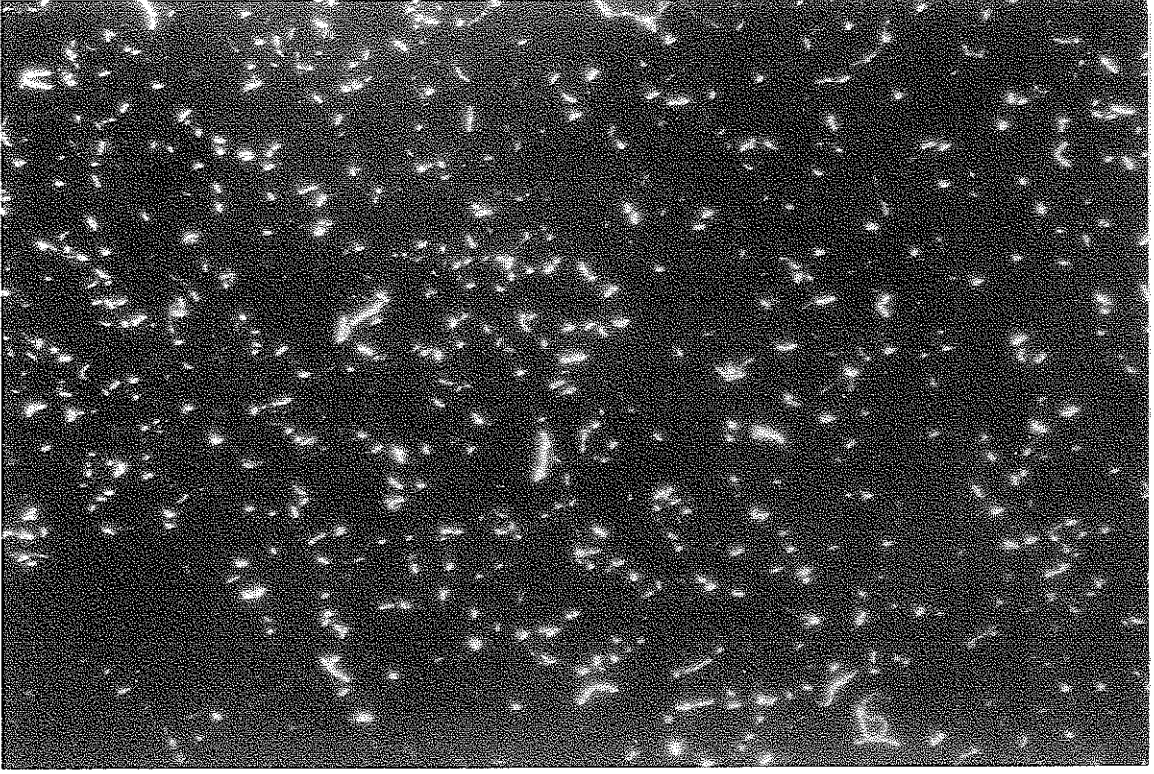
Fotoğraf 1. Pozitif kontrol, 20x'lik objektif ile görüntülenmiştir.



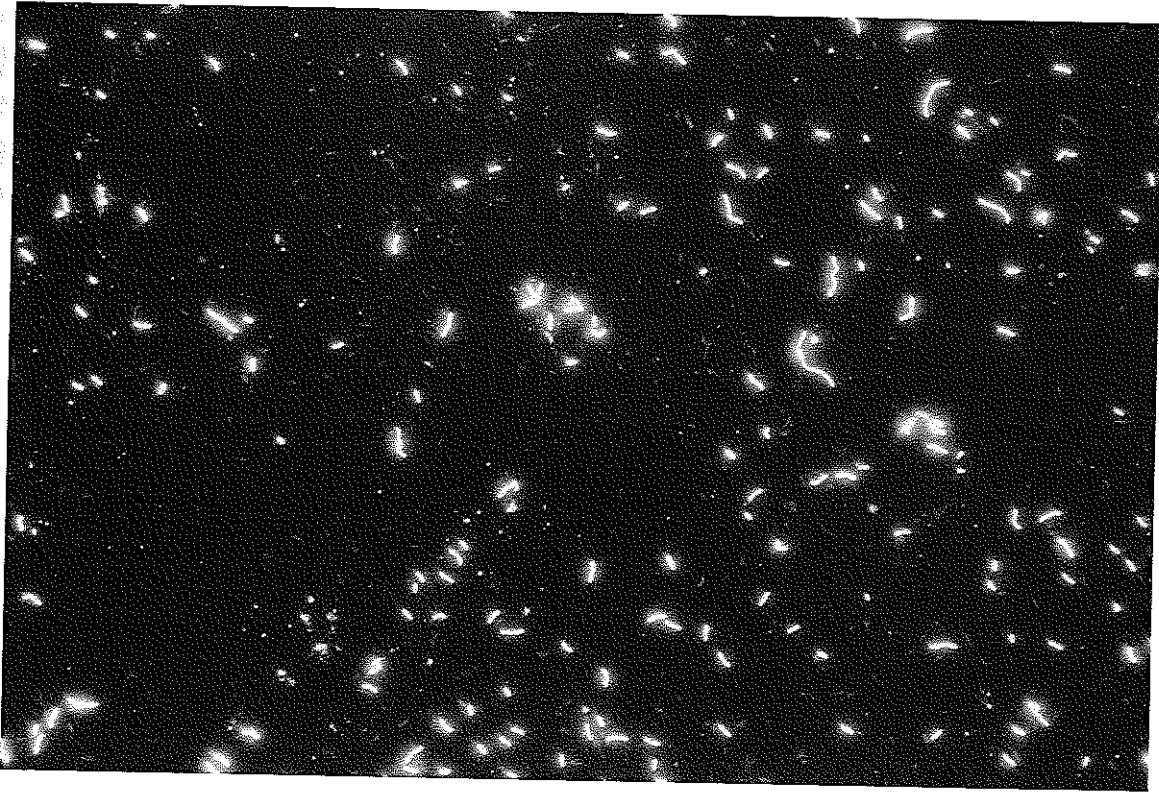
Fotoğraf 2 Negatif kontrol, 20x'lik objektif ile görüntülenmiştir.

Testin uygulanışı ve sonuçların değerlendirilmesi, kitin çalışma prensibine uygun olarak yapılmıştır: *L pneumophila* serogrup 1-6 antijenleri ile kaplı her bir lam, 18 kuyucuk içermektedir. İncelenen serum örnekleri ile kit'e ait kontrol serumları 1/64, 1/128 ve 1/256 oranında dilüe edilmiştir. İlk aşamada, dilüe edilen serumları içeren preparatlar, 30 dakika, oda ısısında ve nemli ortamda enkübe edilmiştir. Yüksek dilüsyondan düşük dilüsyona doğru, vertikal doğrultuda, üzerinden PBS akıtılan lamalar, daha sonra iki kez beşer dakika PBS içeren kaplarda yüzdürülerek yıkanmıştır. İkinci aşamada konjugat (FITC işaretli anti human IgG) ilave edilen preparatlar, tekrar 30 dakika, oda ısısı ve nemli ortamda enkübe edilmiştir. İlk aşamadaki gibi yıkama işleminden sonra 365-546 nm dalga boyutundaki fluoresan mikroskopunda, 20x'lik ve 100x'lük objektif ile incelenmiştir.

1/256 ve üzerindeki titrelerde, (+1) – (+4) arasında fluoresan veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Fotoğraf 3, Fotoğraf 4).



Fotoğraf 3. (+1) pozitif örnek, 20x'lik objektif ile görüntülenmiştir.



Fotoğraf 4. (+4) pozitif örnek, 20x'lik objektif ile görüntülenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, IFA yöntemi ile, 122 hemodiyaliz hastasının 23 (%18.9)'ünde, 86 kontrol grubunun ise 4 (%4.7)'ünde *L.pneumophila* antikorları saptanmıştır. Hemodiyaliz hastalarında gözlenen yüksek antikor pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo4.1).

Tablo4.1: Hemodiyaliz hastaları ve kontrol grubunda *L.pneumophila* antikor prevalansı

	IFA (+)		IFA (-)	
	n	%	n	%
Hasta grubu	23	18.9	99	81.1
Kontrol grubu	4	4.7	82	95.3
Toplam	27	13.0	181	87.0

$$\chi^2 = 9.0, p = 0.003.$$

Hasta grubu, hemodiyaliz süreleri açısından incelendiğinde, IFA yöntemiyle *L.pneumophila* antikorları saptanan 23 hastanın ortalama hemodiyaliz süresi 40.2 ± 27.9 ay, antikor saptanmayan 99 hastanın ortalama hemodiyaliz süresi ise 29.2 ± 21.8 ay olarak bulunmuştur. Sonuçlar 'iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (Student t)' ile değerlendirildiğinde; iki grubun ortalama hemodiyaliz süresi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo4.2).

Tablo4.2: Hasta grubunda, *L pneumophila* antikor pozitifliği ile hemodiyaliz süresi arasındaki ilişki.

	Hasta sayısı	Hemodiyaliz süresi (ay olarak)
IFA (+)	23	40.2
IFA (-)	99	29.2

Student t, $p=0.042$,

Ortalama hemodiyaliz süreleri arasındaki fark = 11.0 ± 5.3 ay,

İncelediğimiz 122 hemodiyaliz hastasının yaş ortalaması 39.8 ± 13.2 , 86 sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ise 37.1 ± 10.1 olarak bulunmuştur. Sonuçlar 'iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (Student t)' ile değerlendirildiğinde; iki grubun yaş ortalaması arasındaki fark istatistikel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo4.3).

Tablo4.3: Hasta ve kontrol grubunun, yaş ortalamaları.

	n	Yaş ortalaması
Hasta grubu	122	39.8
Kontrol grubu	86	37.1

Student t, Yaş ortalamaları arasındaki fark = 2.7 ± 1.7 , $p= 0.11$

Hasta grubundaki olgular yaş ortalamaları açısından incelendiğinde; *L pneumophila* antikoru saptanan 23 olgunun yaş ortalaması 38.5 ± 12.1 , antikor saptanmayan 99 olgunun yaş ortalaması 40.1 ± 13.4 olarak bulunmuştur. Sonuçlar 'iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (Student t)' ile

değerlendirildiğinde, iki grubun yaş ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo4.4).

Tablo4.4: Hasta grubundaki antikor pozitif ve negatif olguların yaş ortalamaları.

	Hasta sayısı	Yaş ortalaması
IFA (+)	23	38.5
IFA (-)	99	40.1

Student t, yaş ortalamaları arasındaki fark= 1.6 ± 3.1 , $p= 0.61$

Kontrol grubundaki *L.pneumophila* antikoru pozitif (n=4) ve negatif (n=182) örnekler, yaş ortalaması açısından incelenmiştir. Sonuçlar 'Mann-Whitney U' testi ile değerlendirilmiş, iki grubun yaş ortalaması arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.758$).

L.pneumophila antikoru saptanan olgular, cinsiyete göre değerlendirildiğinde, hasta ve kontrol grubunda, kadın-erkek oranı arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo4.5.ve Tablo4.6).

Tablo4.5: Hemodiyaliz hasta grubunda, *L.pneumophila* antikoru saptanan olguların cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	IFA (+)		IFA (-)	
	n	%	n	%
Kadın	6	11.1	48	88.9
Erkek	17	25.0	51	75.0

$\chi^2 = 3.79$, $p = 0.051$

Tablo4.6: Kontrol grubunda *L pneumophila* antikoru saptanan olguların cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	IFA (+)		IFA (-)	
	n	%	n	%
Kadın	2	4.8	40	95.2
Erkek	2	4.5	42	95.5

$\chi^2 = 0.002, p = 0.96$

5. TARTIŞMA

L pneumophila'nın, 1977 yılında pnömoni etkeni olarak tanımlanmasından sonra, günümüze değin çok sayıda nozokomiyal veya toplumdaki kazanılmış, epidemik ve sporodik Lejyoner hastalığı olguları bildirilmiştir (156-159). Başlıca enfeksiyon kaynakları; soğutma kuleleri, sıcak su sistemleri ve evaporatif kondansatörlerdir (51). Bunun yanısıra, hastalığın oluşumu ve seyrini etkileyen bireysel risk faktörleri, epidemiyolojik çalışmalar ile belirlenmiştir. Risk faktörleri; özellikle sigara kullanımı, ilerlemiş yaş, erkek cinsiyet, kronik akciğer hastalığı ve immunsupresyondur. İmmunsupresyon çeşitli hastalıklar veya transplantasyon nedeni ile kemoterapi veya steroid kullanımına bağlı gelişebilmektedir (12).

İnsanlara gözlenen Legionella enfeksiyonlarının primer etkeni özellikle, *L pneumophila* serogrup 1'dir (12). Ancak, laboratuvarlarda, Lejyoner hastalığının tanısına yönelik testler rutin olarak uygulanmadığı için, olguların büyük kısmı saptanamamaktadır. Bu nedenle, Legionella enfeksiyonlarının prevalansını belirleyebilmek açısından epidemiyolojik çalışmalar önemlidir. İFA, ELISA ve mikroaglutinasyon gibi serolojik yöntemler bu amaçla kullanılmaktadır (160-163). Belirtilen yöntemler ile, gerek sağlıklı popülasyonda (161,162), gerekse risk grupları ve şüpheli Lejyoner hastalığı olgularında (160,164,165) çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmamızda; *L pneumophila* (serogrup 1-6) antikor prevalansı, 122 hemodiyaliz hastası ile 86 kontrol grubu serum örneğinde, İFA yöntemi ile araştırılmıştır. Hemodiyaliz hastalarının 23 (%18.9)'ünde, kontrol grubunun ise

4 (%4.7)'ünde pozitiflik saptanmış olup, hasta grubunda gözlenen yüksek antikor pozitifliği (%18.9), istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo4.1).

1991 yılında, Marimoto T'nin yaptığı bir çalışmada, 269 hemodiyaliz hastası ile 353 sağlıklı bireyde, IFA yöntemiyle, *L pneumophila* (serogrup 1-6) antikor prevalansı araştırılmıştır. Antikor titresi, kontrol grubunun %77.3 (273)'ünde 1/4'den düşük iken, %1.7 (6)'sinde 1/32 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda 1/64 veya daha yüksek antikor pozitifliği bulunmamıştır. Hemodiyaliz hastalarının; %64.3 (173)'ünde 1/4'den düşük, %4.9 (13)'unda 1/64'e eşit veya daha yüksek ve %1.9 (5)' unda 1/128 titrede antikor saptanmıştır. Hemodiyaliz hastalarında saptanan yüksek pozitiflik, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (166).

Katz SK ve arkadaşları, 1989 yılında yaptıkları bir araştırmada, 231 hemodiyaliz hastası ile 134 sağlıklı bireyi, *L pneumophila* (serogrup 1-6) ve *L micdadei* antikor prevalansı açısından incelemişler, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır (167).

Sağlıklı bireylerdeki Legionella türlerine ilişkin antikor prevalansı, çeşitli ülkelerde araştırılmasına karşın (161,162,168), hemodiyaliz hastalarındaki prevalans çalışmaları sınırlı sayıdadır (166,167).

1994 yılında, İspanya'daki bir hastanenin hemodiyaliz ünitesinde bulunan 36 hastanın sekizinde klinik ve radyolojik olarak Lejyoner hastalığı salgını saptanmıştır. Dördü kadın, dördü erkek, yaş ortalamaları 61 olan ve immunsupresif tedavi almayan sekiz hastadan ikisinde (%25), IFA yöntemiyle *L pneumophila* serogrup 1 ve 4'e karşı pozitiflik saptanmıştır. Araştırmacılar %25'lik düşük serokonversiyonu, hastaların zayıf immunolojik yanıtı veya serokonversiyonun haftalar sonra gelişebilmesi ya da hiçbir zaman gözlenemeyebileceği ile açıklamışlardır. Epidemiyoloji şüphesi nedeni ile enfeksiyon kaynağı araştırılmış, sıcak su musluklarından ve nemlendiricilerden *L pneumophila* serogrup 1 ve 4 izole edilmiştir. *L pneumophila*, hastane su

sistemlerinin diğer bölgelerinden de izole edilmesine karşın, hemodiyaliz ünitesi dışında Lejyoner hastalığı olgusu tanımlanmamıştır (169).

1988 yılında, Thacker ve arkadaşları, son dönem böbrek yetmezliği ve bronkopnömonisi olan bir hemodiyaliz hastasının, açık akciğer biopsi örneğinden, *L. cincinnatiensis* izole etmişlerdir (170).

Vural T ve arkadaşlarının 1997 yılında sundukları bir çalışmada, altısı immunkompromize olan (ikisi renal transplant alıcısı, ikisi hemodiyaliz hastası, biri kaviter akciğer hastalığı ve biri poliarteritis nodosa) dokuz hastada, DFA ve kültür yöntemi ile *L. pneumophila* serogrup 1 saptanmıştır (171).

Diyaliz hastalarındaki, başlıca morbidite ve mortalite sebeplerinden biri olan hemodiyalizin, immun sistem üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, sellüloz membran içeren hemodiyalizlerin, kompleman ve granülosit aktivasyonuna ve rebound lökositoz ile izlenen derin bir granülositopeniye yol açtığı anlaşılmıştır (172-175). Bir kompleman inhibitörü olan, solubl kompleman reseptör 1 (sCR1) ile yapılan deneysel hemodiyaliz modelinde, sCR1'in, kompleman aktivasyonunu tamamen bozduğu, granülosit adezyon moleküllerini değiştirdiği ve kısmen granülosit reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (174).

1993 yılında, Falkenhagen D ve arkadaşları, beş diyaliz merkezinde, yedi farklı diyaliz tipini incelemişler; bakır amonyum sellüloz içerenlerin gerek beyaz kan hücreleri sayısında (monosit, nötrofil, lenfosit) gerekse kompleman aktivasyonunda en büyük değişikliğe neden olduğunu saptamışlardır (172).

Granülosit reaktif oksijen türevlerinin oluşumu, komplemanı aktive eden ve aktive etmeyen membranlar ile incelenmiştir. Komplemanı aktive eden membran ile yapılan hemodiyalizin, granülosit reaktif oksijen türevi (hidrojen peroksit) oluşumunu arttırmasına karşın, daha sonra, diyaliz işlemi süresince, *S. aureus*'a karşı, reaktif oksijen türevi oluşumunun azaldığı görülmüştür (176). Cuprophane membran içeren hemodiyaliz ile yapılan başka bir çalışmada, diyalizin başlangıcında monosit ve polimorfonükleer lökositler

tarafından reaktif oksijen türevi üretiminin arttığı, ancak daha sonra ekzojen verilen C_{3a} ve F-Met-Leu-Phe (FMLP) 'ye karşı granülosit yanıtında bir azalma olduğu saptanmıştır (177). Bu sonuçlar hemodiyalize ilişkin patoloji ve enfeksiyona duyarlılıkta, granülositlerin ürettiği reaktif oksijen türevlerinin rolünü göstermiştir.

Yaptığımız çalışma sırasında; A.S. isimli bir bayan hemodiyaliz hastasında, IFA yöntemi ile antikor negatifliği saptanmasına karşın, iki ay sonra hastada akut legionellozis tablosu gözlenmiş, tanı DFA ve kültür yöntemi ile doğrulanmıştır.

Transplant hastalarında, nakledilen organın fonksiyonu ve rejeksiyonu dışında, en önemli sorun erken ve geç dönemde ortaya çıkan enfeksiyonlardır. Bu hastalarda enfeksiyona olan eğilimi, transplantasyona ve immunsupresyona ait faktörler arttırmaktadır(178). Transplant hastalarında gözlenen Legionellozis olgularına ilişkin çok sayıda yayın bildirilmiştir (179-182).

Lo Presti ve arkadaşları, 1997 yılı Temmuz ayında, bir karaciğer transplant hastasının trakeal aspirat örneğinden, *L. parisiensis* izole etmişlerdir (179).

Harrington RD ve arkadaşları, 1996 yılında yayınladıkları bir makalede, kemik iliği transplantasyon merkezinde, 1993 yılına dek altı yıllık bir periyodda, kültür yöntemi ile doğrulanmış 10 Lejyoner hastalığı olgusu bildirmişlerdir (180).

Singh N ve arkadaşları, 1996 yılında yaptıkları bir prospektif çalışmada, 101 karaciğer transplant hastasına siklosporin yerine yeni bir immunsupresif olan tacrolimus uygulayarak, transplantasyon sonrası enfeksiyon etkenleri arasında farklılık olup olmadığını araştırmışlar; enfeksiyon etkeni olarak CMV ve *P. carinii* oranı azalmasına karşın, bakteriyel pnömonilerin %27'sinde Legionella türlerini etken olarak saptamışlardır (181).

Patel R ve arkadaşlarının, 1997 yılı Ocak ayında yayınladığı bir makalede, transplantasyon sonrasında gözlenen enfeksiyon nedenleri; cerrahi

faktörler, immunsupresyon ve çevresel temaslar olarak bildirilmekte, Legionella türleri ile oluşan oportunistik bakteriyel enfeksiyonların önemi vurgulanmaktadır (183).

Sonuç olarak; Lejyoner hastalığı, genellikle 50 yaş üstü, immunsuprese, sigara ve alkol bağımlılığı gibi predispozan faktörlerin bulunması halinde salgın ile ortaya çıkabilen, hayatı tehdit edici ve laboratuvarların yetersizliği nedeni ile sıklıkla tanımlanamayan bir enfeksiyondur.

6. SONUÇ

L. pneumophila, başlıca Lejyoner hastalığı ve Pontiac ateşi olmak üzere çeşitli klinik tablolara sebep olabilmektedir. Gerek su sistemlerindeki kolonizasyonu, gerekse immün supresyonun önemli risk faktörlerinden biri olması, nosokomiyal olguların insidansını arttırmaktadır.

Çalışmamızda, IFA yöntemi ile hemodiyaliz hastalarının %18,9' unda, kontrol grubunun ise %4,7' sinde *L. pneumophila* antikoruna saptanmıştır.

Hemodiyaliz süresi *L. pneumophila* antikoruna saptananlarda 40,2 ay antikor saptanmayanlarda 29,2 ay olup, hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Hasta ve kontrol grubunun, yaş ortamları ile kadın-erkek cinsiyet oranı arasında, istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda, antikor prevalansı ve hemodiyaliz süresi hasta grubunda anlamlı bulunmasına karşın, gerek konuyla ilgili yeterli sayıda araştırma yapılmaması, gerekse sonuçların çelişkili olması (166,167), bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

7. ÖZET

Çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi hemodiyaliz hastalarına ait serum örneklerinde, *L. pneumophila* antikor prevalansı ve hemodiyaliz süresi incelenmiştir.

IFA yöntemi ile, 122 hemodiyaliz hastası ve 86 kontrol grubu serum örneğinde *L. pneumophila* antikor prevalansı araştırılmıştır. Hasta grubunun 23 (%18,9)'ünde, kontrol grubunun ise 4 (%4,7)'ünde pozitiflik saptanmıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,003$).

Hasta grubu hemodiyaliz süreleri açısından incelenmiş; *L. pneumophila* antikoru saptanan 23 hastanın ortalama hemodiyaliz süresi 40,2 ay; antikor saptanmayan 99 hastanın ise 29,2 ay olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,042$).

Hasta ve kontrol grubunun yaş ortalamaları karşılaştırıldığında; hasta grubunun yaş ortalaması 39,8; kontrol grubunun yaş ortalaması ise 37,1 olup, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,11$).

Hasta grubundaki, *L. pneumophila* antikoru pozitif ($n=23$) ve negatif ($n=99$) olgular yaş ortalamaları açısından karşılaştırılmıştır. Pozitif olguların yaş ortalaması 38,5, negatif olguların yaş ortalaması 40,1 olup, iki grup arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,61$).

Kontrol grubundaki, *L. pneumophila* antikoru pozitif ($n=4$) ve negatif ($n=182$) örnekler yaş ortalaması açısından karşılaştırılmış; iki grup arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,758$).

Hemodiyaliz hasta grubunda, *L. pneumophila* antikoru saptanan olguların cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde, kadın- erkek arasındaki oran farklı gözükmesine karşın, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,051$).

Kontrol grubunda, *L. pneumophila* antikoru saptanan örneklerin cinsiyete göre dağılımı incelenmiş, kadın-erkek oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,96$).

8. KAYNAKLAR

1. Fraser DW, Tsai T, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 1977; 297: 1189-97.
2. Terranova W, Cohen ML, Fraser DW. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet.* 1978; 2: 122-4.
3. Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO, et al. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol.* 1983;117:60-7.
4. Thacker SB, Bennett JV, Tsai TF, et al. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. *J Infect Dis.* 1978; 138: 512-9.
5. McDade JE, Brenner DJ, Bazeman FM, Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann Intern Med.* 1979; 90: 659-61.
6. Pasculle AW. Legionella In: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weisfeld AS, Tilton RC eds. *Clinical and Pathogenic Microbiology.* St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1994: 461-6.
7. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* 1977 ;297:1197-1203.
8. Brenner DJ ,Steigerwalt AG ,McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila* , genus novum , species nova , of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med.* 1979; 90: 656-8.
9. Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol.*1991 ;137:1215-22.
10. Harrison TG, Saunders NA. Taxonomy and typing of legionellae. *Rev Med Microbiol.* 1994 ;5: 79-90.

11. Brenner DJ. Classification of the legionellae. *Semin Respir Infect.* 1987;2: 190-205.
12. Yu. VL. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' Disease). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. *Principles and Practice of Infectious Disease.* 4 th ed. New York: Churchill Livingstone Inc. 1995: 2087-97.
13. Collins MT, Bangsberg J, Hoiby N. Antigenic heterogeneity among *Legionella*, *Fluoribacter* and *Tatlockia* species analyzed by crossed immunoelectrophoresis. *Int J Syst Bacteriol.* 1987 ;35:1-6.
14. Jantzen E, Sonesson A, Tangen T, Eng J. Hydroxy- fatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis. *J Clin Microbiol.* 1993 ;31:1413-9.
15. Benson RF, Thacker WL, Daneshvar MI, Brenner DJ. *Legionella waltersii* sp. nov and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 ;46:631-4.
16. Dennis PJ, Brenner DJ, Thacker WL, et al. Five new *Legionella* species isolated from water. *Int J Syst Bacteriol.* 1993 ;43:329-37.
17. Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R, Hacker J. Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J Gen Microbiol.* 1991 ;137: 1955-61.
18. Hindahl M, Iglewski B. Outer membrane proteins from *L pneumophila* serogroups and other *Legionella* species. *Infect Immun.* 1986;51: 94-101.
19. Nolte FS, Conlin CA. Major outer membrane protein of *L pneumophila* carries a species-specific epitope. *J Clin Microbiol.* 1986;23:643-6.
20. Gabay J Blake M, Niles W, Horwitz MA. Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol.* 1985;162: 85-91.

21. Ciesielski CA, Blaser MJ, Wang WLL. Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect Immun.* 1986;51:397-404.
22. Baine WB. Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species. *J Gen Microbiol.* 1985 ;131: 1383-91.
23. Conlan JW, Williams A, Ashworth LA. In vivo production of a tissue-destructive protease by *Legionella pneumophila* in the lungs of experimentally infected guinea-pigs. *J Gen Microbiol.* 1988 ;134:143-9.
24. Baskerville A ,Conlan JW, Ashworth LA, Dowsett AB. Pulmonary damage caused by a protease from *Legionella pneumophila* . *Br J Exp Pathol.* 1986; 67: 527-36.
25. Chen GC, Brown A, Lema MW. Restriction endonuclease activities in the legionellae. *Can J Microbiol.* 1986 ;32: 591-3.
26. Friedman RL, Lochner JE, Bigley RH, Iglewski BH. The effects of *Legionella pneumophila* toxin on oxidative processes and bacterial killing of human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis.* 1982 ;146: 328-34.
27. Thorpe TC, Miller RD. Extracellular enzymes of *Legionella pneumophila* . *Infect Immun.* 1981 ;33: 632-5.
28. Lochner JE, Bighley RH, Iglewski BH. Defective triggering of polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism by *Legionella pneumophila* toxin. *J Infect Dis.* 1985 ;151:42-6.
29. Dreyfus LA, Iglewski BH. Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila* . *Infect Immun.* 1986; 51:736-43.
30. Quinn FD, Tompkins LS. Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing hemolytic and cytotoxic activities. *Mol Microbiol.* 1989; 3: 797-805.

31. Keen MG, Hoffman PS. Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. *Infect Immun.* 1989; 57: 732-8.
32. States SJ, Conley LF, Kuchta JM, et al. Survival and multiplication of *Legionella pneumophila* in municipal drinking water systems. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53: 979-86.
33. Wadowsky RM, Yee RB. Effect of non Legionellaceae bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 49: 1206-10.
34. Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 51: 422-4.
35. Kuchta JM, States SJ, McNamara AM, Wadowsky RM, Yee RB. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. *Appl Environ Microbiol.* 1983; 46: 1134-9.
36. Muraca P, Stout JE, Yu VL. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53: 447-53.
37. Witherall LE, Duncan R, Stone K, et al. Investigation of *L. pneumophila* in drinking water. *J Am Water Works Assoc.* 1988; 80: 87-93.
38. Stout JE, Yu VL, Best MG. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 49: 221-8.
39. Groothuis DG, Veenendaal HR, Dijkstra HL. Influence of temperature on the number of *Legionella pneumophila* in hot water systems. *J Appl Bacteriol.* 1985; 59: 529-36.
40. Lee TC, Stout JE, Yu VL. Factors predisposing of *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems. *Arch Environ Health.* 1988; 43: 59-62.

41. Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, et al. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. *Infect Control*. 1987; 8: 357-63.
42. Wright JB, Ruseska I, Athar MA, Corbett S, Costerton JW. *Legionella pneumophila* grows adherent to surfaces in vitro and in situ. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1989; 10: 408-15.
43. Rogers J, Keevil CW. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58: 2326-30.
44. Alary M, Joly JR. Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by legionellae. *J Infect Dis*. 1992; 165: 565-9.
45. Tobin RS, Ewan P, Walsh K, et al. A survey of *Legionella pneumophila* in water in 12 Canadian cities. *Water Res*. 1986; 20: 495-501.
46. Stout JE, Yu VL, Vickers RM, et al. Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in the water supply of a hospital with endemic legionnaires' disease. *N Engl J Med*. 1982; 306: 466-8.
47. Best M, Yu VL, Stout J, Goetz A, Muder RR, Taylor F. Legionellaceae in the hospital water supply. Epidemiological link with disease and evaluation of a method for control of nosocomial legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. *Lancet*. 1983; 2: 307-10.
48. Johnson JT, Yu VL, Best MG, et al. Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. *Lancet*. 1985; 2: 298-300.
49. Muraca PW, Stout JE, Yu VL, Yee YC. Legionnaires' disease in the work environment: implications for environmental health. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1988; 49: 584-90.

50. Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Jeidel K, Pohle HD. Nosocomial *Legionella pneumophila* : demonstration of potable water as the source of infection. *Epidemiol Infect.* 1988; 101:647-54.
51. Vural T. Legionella İnfeksiyonlarında Tanı Sorunu. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Program ve Özet Kitabı (Eds: Tekeli E. Willke A)'nda Antalya, 6-10 Ekim 1997, 315-25.
52. Barbaree JM. Selecting a subtyping technique for use in investigations of legionellosis epidemics. In *Legionella: Current status and emerging perspectives*, eds. Barbaree JM, Breisman RF, Dufour AP. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993. 169-172.
53. Joly JR, Mc Kinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1986; 23: 768-71.
54. Nolte FS, Conlin CA, Roisin AJ, Redmond SR. Plasmids as epidemiological markers in nosocomial Legionnaires' disease. *J Infect Dis.* 1984; 149: 251-6.
55. Ott M, Bender L, Marre R, Hacker, J. Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial Legionella. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 813-5.
56. Struelens MJ, Maes N, Rost F, et al. Genotypic and phenotypic methods for the investigation of a nosocomial *Legionella pneumophila* outbreak and efficacy of control measures. *J Infect Dis.* 1992; 166: 22-30.
57. Grimont F, Lefevre M, Ageron E, Grimont PA. rRNA gene restriction patterns of Legionella species: a molecular identification system. *Res Microbiol.* 1989; 140: 615-26.
58. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, et al. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2872-5.

59. Whitney CG, Hofmann J, Pruckler JM, et al. The role of arbitrarily primed PCR in identifying the source of an outbreak of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1800-4.
60. Keller DW, Hajjeh R, DeMaria A, et al. Community outbreak of Legionnaires' disease: an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit *Legionella* species. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 257-61.
61. Kovick JA, Yu VL. Legionnaires' disease: an emerging surgical problem. *Ann Thorac Surg.* 1987; 43: 341-7.
62. Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, et al. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol.* 1981; 114: 337-47.
63. Addiss DG, Davis JP, Laventure M, Wand PJ, Hutkhinson MA, McKinney RM. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *Am J Epidemiol.* 1989; 130: 557-68.
64. Woo AH, Yu VL, Goetz A. Potential in-hospital modes of transmission of *Legionella pneumophila*. Demonstration experiments for dissemination by showers, humidifiers, and rinsing of ventilation bag apparatus. *Am J Med.* 1986; 80: 567-73.
65. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *App Environ Microbiol.* 1985; 50: 1128-31.
66. Johnson JT, Yu VL, Wagne RL, Bent MG. Nosocomial Legionella pneumonia in a population of head and neck cancer patients. *Laryngoscope.* 1985; 95: 1468-71.
67. Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ, Pohle HD. The incidence of legionella pneumonia: a 1-year prospective study in a large community hospital. *Lung.* 1989; 167: 11-22.

68. Marston BJ, Plouffe JF, File, TM Jr, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch Intern Med. 1997; 157: 1709- 8.
69. Bates JH, Camphell GD, Barron AL, et al. Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized patients. Chest. 1992;101: 1005-1012.
70. Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ, Pohle HD. Incidence and clinical features of community-acquired legionellosis in hospitalized patients. Eur Respir J. 1989; 2:257-62.
71. Klimek JJ, Ajemian E, Fontecchio S, Gracewski J, Klemas B, Jimenez L. Community-acquired bacterial pneumonia requiring admission to hospital. Am J Infect Control. 1983;11: 79-82.
72. Aubertin J, Dabis F, Fleurette J, et al. Prevalence of legionellosis among adults: a study of community-acquired pneumonia in France. Infection. 1987;15:328-31.
73. Macfarlane JT, Finch RG, Ward MJ, Macrae AD. Hospital study of adult community-acquired pneumonia. Lancet. 1982; 2: 255-8.
74. Fang GD, Fine M, Orloff J, et al. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multi center study of 359 cases. Medine (Baltimore). 1990; 69: 307-16.
75. Roig J, Aguilair X, Ruiz J, et al. Comparative study of *Legionella pneumophila* and other nosocomial- acquired pneumonias. Chest. 1991; 99: 344-50.
76. Yu VL, Kroboth FJ, Shonnard J, Brown A, McDearman S, Magnussen M. Legionnaires' disease: new clinical perspective from a prospective pneumonia study. Am J Med. 1982; 73: 357-61.
77. Yu VL, Beem TR Jr, Lumish RM, et al. Routine culturing for Legionella in the hospital environment may be a good idea: a three-hospital prospective study. Am J Med Sci. 1987; 294: 97-9.

78. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med. 1994; 154: 2417-22.
79. Horie H, Kawakami H, Minoshima K, et al. Neonatal legionnaires' disease. Histopathological findings in an autopsied neonate. Acta Pathol Jpn. 1992; 42: 427-31.
80. Holmberg RE, Pavia AT, Montgomery D, et al. Nosocomial Legionella pneumonia in the neonate. Pediatrics. 1993; 92: 450-3.
81. Pachon J, Prados MD, Capote F, et al. Severe community acquired pneumonia-biology, prognosis, and treatment. Am Rev Respir Dis. 1991; 142: 369-73.
82. Torres A, Serra-Batilles, Ferrer A, et al. Severe community-acquired pneumonia. Epidemiology and pronostic factors. Am Rev Respir Dis. 1991; 144: 312-8.
83. Dournon E, Bibb WF, Rajagopalan P, et al. Monoclonal antibody reactivity as a virulence marker for *Legionella pneumophila* serogrup 1 strains. J Infect Dis. 1988; 157: 496-501.
84. Stout J, Joly J, Para P, et al. Comparison of molecular methods for subtyping patient and epidemiologically-linked environmental isolates of *Legionella pneumophila* . J Infect Dis. 1988; 157: 486-95.
85. Bollin GE, Plouffe JE, Para MF, et al. Difference in virulence of enviromental isolates of *Legionella pneumophila* . J Clin Microbiol. 1985; 21: 674-7.
86. Baskerville A, Fitzgeorge RB, Broster M, Hambleton P. Histopathology of experimental Legionnaires' disease in guinea pigs, rhesus monkeys and marmosets. J Pathol. 1983; 139: 349-62.
87. Davis GS, Winn WC, Gump DW, et al. Legionnaires' pneumonia after aerosol exposure in guinea pigs and rats. Am Rev Respir Dis. 1982; 126: 1050-7.

88. Nash TW, Libby DM, Horwitz MA. Interaction between the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) and human alveolar macrophages. Influence of antibody, lymphokines, and hydrocortisone. J Clin Invest. 1984; 74: 771-82.
89. Horwitz MA. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J Exp Med. 1983; 158: 2108-26.
90. Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. J Exp Med. 1983; 158: 1319-31.
91. Davis GS, Winn W, Gump DW, et al. The kinetics of early inflammatory events during experimental pneumonia due to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. J Infect Dis. 1983; 148: 823-35.
92. Rolstad B, Berdal B. Immune defenses against *Legionella pneumophila* in rats. Infect Immun. 1981; 32: 805-12.
93. Breiman RF, Horwitz MA. Guinea pigs sublethally infected with aerosolized *Legionella pneumophila* develop humoral and cell-mediated immune responses. J Exp Med. 1987; 164: 799-811.
94. Blanchard DK, Friedman H, Klein TW, Djeu JY. Induction of interferon-gamma and tumor necrosis factor by *Legionella pneumophila*: augmentation of human neutrophil bactericidal activity. J Leukoc Biol. 1989; 45: 538-45.
95. Nash TW, Libby DM, Horwitz MA. IFN-gamma-activated human alveolar macrophages inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. J Immunol. 1988; 140: 3978-81.
96. Bhardwaj N, Nash TW, Horwitz MA. Interferon-gamma-activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. J Immunol. 1986; 137: 2662-9.
97. Skerrett SJ, Martin TR. Tumor necrosis factor and lipopolysaccharide potentiate gamma interferon-induced resistance of alveolar macrophages to

- Legionella pneumophila*. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP, eds. *Legionella-Current Status and Emerging Perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1993; 105-6.
98. Blanchard DK, Djeu JY, Klein TW, Friedman H, Stewart WE 2d. Protective effects of tumor necrosis factor in experimental *Legionella pneumophila* infections of mice via activation of PMN function. *J Leukoc Biol*. 1988; 43: 429-35.
99. Blachard DK, Djeu JY, Klein TW, Friedman H, Stewart WE 2d. Induction of tumor necrosis factor by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 1987; 55: 433-7.
100. Byrd TF, Horwitz MA. Interferon gamma- activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J Clin Invest*. 1989; 83: 1457-65.
101. Blanchard DK, Stewart WE 2d, Klein TW, Friedman H, Djeu JY. Cytolytic activity of human peripheral blood leukocytes against *Legionella pneumophila*-infected monocytes: characterization of the effector cell and augmentation by interleukin 2. *J Immunol*. 1987;139: 551-6.
102. Mintz CS, Schultz DR, Arnold PI, Johnson W. *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect Immun*. 1992; 60: 2769-76.
103. Bellinger-Kawaharo C, Horwitz MA. Complement component C₃ fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome- MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med*. 1990; 172: 1201-10.
104. Mintz CS, Arnold PI, Jonhson W, Schultz DR. Antibody- independent binding of complement component C_{1q} by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 1995; 63: 4939-43.

105. Dowling JN, Saha AK, Glew RH. Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiol Rev.* 1992; 56: 32-60.
106. Cianciotto NP, Bangsberg JM, Eisenstein BI, Engleberg NC. Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*. *Infect Immun.* 1990; 58: 2912-18.
107. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC. A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis.* 1990; 162: 121-126.
108. Cianciotto NP, Stamos JK, Kamp DW. Infectivity of *Legionella pneumophila* mip mutant for alveolar epithelial cells. *Curr Microbiol.* 1995; 30: 247-250.
109. Bangsberg JM, Cianciotto NP, Hindersson P. Nucleotide sequence analysis of the *Legionella micdadei* mip gene, encoding a 30- kilodalton analog of the *Legionella pneumophila* Mip protein. *Infect Immun.* 1991; 59: 3836-40.
110. Horwitz MA. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell.* 1984; 36: 27-33.
111. Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA. Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 9607-11.
112. Horwitz MA, Maxfield FR. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol.* 1984; 99: 1936-43.
113. Pope CD, O'Connell W, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* mutants that are defective for iron acquisition and assimilation and intracellular infection. *Infect Immun.* 1996; 64: 629-36.
114. Friedman RL, Lochner JE, Bigley RH, Iglewski BH. The effects of *Legionella pneumophila* toxin on oxidative processes and bacterial killing of human polymorphonuclear leucocytes. *J Infect Dis.* 1982; 146: 328-34.
115. Baine WB. Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species. *J Gen Microbiol.* 1985; 131: 1383-91.

116. Baine WB, Rasheed JK, Mackel DC, Bopp CA, Wells JG, Kaufmann AF. Exotoxin activity associated with the Legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol.* 1979; 9: 453-6.
117. Conlan JW, Baskerville A, Ashworth LA. Separation of *Legionella pneumophila* proteases and purification of a protease which produces lesions like those of Legionnaires' disease in guinea pig lung. *J Gen Microbiol.* 1986; 132: 1565-74.
118. Mintz CS, Miller RD, Gutgsell NS, Malek T. *Legionella pneumophila* protease inactivates interleukin-2 and cleaves CD₄ on human T cells. *Infect Immun.* 1993; 61: 3416-21.
119. Kirby BD, Snyder K, Meyer R, et al. Legionnaires' disease: Report of 65 nosocomially acquired cases and a review of the literature. *Medicine.* 1980; 59: 188-205.
120. Johnson JD, Raff M, Van Arsdall J. Neurologic manifestations of legionnaires' disease. *Medicine.* 1984; 63: 303-10.
121. Waldor MK, Wilson B, Swartz M. Cellulitis caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 51-3.
122. Lowry PW, Tompkins LS. Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *Am J Infect Control.* 1993; 21: 21-7.
123. Shah A, Check F, Baskil S, et al. Legionnaires' disease and acute renal failure: Case report and review. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 204-7.
124. Brabender W, Hinthorn DR, Asher M, et al. *Legionella pneumophila* wound infection. *JAMA.* 1993; 250: 3091-5.
125. Tompkins LS, Roessler BJ, Redd SC, Markowitz LE, Cohen ML. *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. *N Engl J Med.* 1988; 318: 9530-5.
126. Schurmann D, Ruf B, Fehrenbach FJ, Jautzke G, Pohle HD. Fatal Legionnaires' pneumonia: frequency of legionellosis in autopsied patients with pneumonia from 1969 to 1985. *J Pathol.* 1988; 155: 35-39.

127. Baron EJ, Finegold SM: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 8 th ed. St Louis, Missouri, The C.V. Mosby Co, 1990; 572-87.
128. Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. J Clin Microbiol. 1989; 27: 1257-61.
129. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, Di Cesare J, Atlas RM. Detection of legionella with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol Cell Probes. 1990;4: 175-87.
130. Catalan V, Moreno C, Dasi MA, Munoz C, Apraiz D. Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in water. Res Microbiol. 1994; 145: 603-10.
131. Palmer CJ, Bonilla GF, Roll B, Paszko-Kolva C, Sangermano LR, Fujioka RS. Detection of legionella species in reclaimed water and air with the Enviro Amp legionella PCR kit and direct fluorescent antibody staining. Appl Environ Microbiol. 1995; 61: 407-12.
132. Mailwald M, Kissel K, Srimuang S, Von Knebel Doeberitz M, Sonntag HG. Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellas in hospital water samples. J Appl Bact. 1994; 76: 216-25.
133. Uldum SA. Evaluation of PCR for detection of legionella DNA in respiratory samples. In Legionella infections and atypical pneumonias, Proceeding of the 11 th meeting of the European Working Group on Legionella Infections, ed. Berdal BP. Oslo, The Norwegian Defence Microbiological Laboratory, 1996; 23.
134. Bernander S, Hanson HS, Johansson B, von stedingk LV. A nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. In Legionella infections and atypical pneumonias, Proceedings of the 11 th meeting of the European Working Group on

- Legionella Infections; ed. Berdal BP. Oslo, The Norwegian Defence Microbiological Laboratory, 1996; 25-7.
135. Mainwald M, Schill M, Stockinger C, et al. Detection of legionella DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995; 14: 25-33.
136. Edelstein PH. Review of azithromycin activity against *Legionella* spp. *Pathol Biol*. 1995; 43: 569-72.
137. Edelstein PH, Edelstein MA, Ren J, Polzer R, Gladue RP. Activity of trovafloxacin (CP-99,219) against *Legionella* isolates: in vitro activity, intracellular accumulation and killing in macrophages, and pharmacokinetics and treatment of guinea pigs with *L. pneumophila* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 314-9.
138. Rajagopalan-Levasseur P, Dournon E, Dameron G, Vilde JL, Pocardalo JJ. Comparative post antibacterial activities of pefloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin against intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; 34: 1733-38.
139. Fitzgeorge RB, Lever S, Baskerville A. A comparison of the efficacy of azithromycin and clarithromycin in oral therapy of experimental airborne Legionnaires' disease. *J Antimicrob Chemother*. 1993; 31 (Suppl E):171-6.
140. Dournon E, Mayaud C, Wolff M, et al. Comparison of the activity of three antibiotic regimens in severe Legionnaires' disease. *J Antimicrob Chemother*. 1990; 26 (Supple B): 129-39.
141. Collins CH, Grange JM. *The Microbiological Hazards of Occupations*. Leeds, U.K. 1990: 86-94.
142. Fliermans CB, Bettinger GE, Fynsk AW. Treatment of cooling systems containing high levels of *Legionella pneumophila*. *Wat Res*. 1982; 16: 903-9.
143. Muraca PW, Yu VL, Goetz A. Disinfection of water distribution systems for legionella: a review of application procedures and methodologies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1990; 11:79-88.

144. Snyder MB, Siwicki M, Wireman J, et al. Reduction in *Legionella pneumophila* through heat flushing followed by continuous supplemental chlorination of hospital hot water. J Infect Dis. 1990; 162: 127-32.
145. Bentham RH, Broadbent CR. Field trial of biocides for control of legionella in cooling towers. Curr Microbi. 1995; 30: 167-72.
146. Yamamoto H, Ezaki T, Ikedo M, Yabuuchi E. Effects of biocidal treatments to inhibit the growth of legionella and other microorganisms in cooling towers. Microbiol Immunol. 1991; 35: 795-802.
147. England AC, Fraser DW, Mallison GF, Mackel DC, Skaliy P, Gorman GW. Failure of *Legionella pneumophila* sensitivities to predict culture results from disinfectant-treated air-conditioning cooling towers. Appl Environ Microbiol. 1982; 43: 240-4.
148. Elsmore R. Biocidal control of legionellae. Isr J Med Sci. 1986; 22: 647-54.
149. Fliermans CB, Harvey RS. Effectiveness of 1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin against *Legionella pneumophila* in a cooling tower. Appl Environ Microbiol. 1984; 47: 1307-10.
150. Herbold K, Flehming B, Botzenhart K. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, polio virus-1, and indicator organisms. Appl Environ Microbiol. 1989; 55: 2949-53.
151. Liu Z, Stout JE, Tedesco L, et al. Controlled evaluation of copper/silver ionization in eradication of *Legionella* from a hospital water distribution system. J Infect Dis. 1994; 919-22.
152. Colville A, Crowley J, Dearden D, et al. Outbreak of legionnaires' disease at a university hospital, Nottingham, Epidemiology, Microbiology and Control Epidemiol Infect. 1993; 10: 105-16.
153. Farr BM, Gratz J, Tartaglino J, et al. Evaluation of ultraviolet light for disinfection of hospital water contaminated with *Legionella*. Lancet. 1988; 2: 669-72.

154. Liu Z, Stout JE, Tedesco L, et al. Ultraviolet light irradiation of potable water for *Legionella* colonization in hospital water distribution system. *ASHRAE Transactions*. 1994; 100: 375.
155. Matulonis U, Rosenfeld CS, Shaddock RK, Prevention of *Legionella* infections in a bone marrow transplant unit: Multifaceted approach to decontamination of a water system. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1993; 14: 571-5.
156. Nechwatal R, Ehret W, Klatte OJ, Zeissler HJ, Prull A, Lutz H. Nosocomial outbreak of legionellosis in rehabilitation center. Demonstration of potable water as a source. *Infection*. 1993; 21: 235-40.
157. England AC 3d, Fraser DW, Plikeytis BD, Tsai TF, Storch G, Brome CV. Sporadic legionellosis in the United States: the first thousand cases. *Ann Intern Med*. 1981; 94: 164-70.
158. Cordes LG, Fraser DW, Skaliy P, et al. Legionnaires' disease outbreak at an Atlanta, Georgia, Country club: evidence for spread from an evaporative condenser. *Am J Epidemiol*. 1980; 111: 425-31.
159. Stout JE, Yu VL, Muraca P, Joly J, Troup N, Tompkins LS. Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired legionnaires' disease. *N Engl J Med*. 1992; 326: 151-5.
160. Freedman AP, Katz SM. The prevalence of serum antibodies to *Legionella pneumophila* in patients with chronic pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1981; 123: 238-9.
161. Helms CM, Renner ED, Viner JP, Hierholzer WJ Jr, Wintermeyer LA, Jonnson W. Indirect immunofluorescence antibodies to *Legionella pneumophila* : frequency in a rural community. *J Clin Microbiol*. 1980; 12: 326-8.
162. Smalley DL, Ourth DD. Seroepidemiology of *Legionella pneumophila* . A study of adults from Memphis, Tennessee, USA. *Am J Clin Pathol*. 1981; 75: 201-3.

163. Re MC, Baldassarri B, Furlini G, Coppolecchia P, Landini MP. Detection of antibodies to *Legionella pneumophila* serogroup 1 by indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Boll Ist Sieroter Milan*. 1984; 63: 136-9.
164. Cheresky AY, Metcalfe RV, Bettelheim KA. Serological studies on patients with suspected legionellosis in New Zealand. *Infection*, 1985;13:167-8.
165. Nichol KL, Parenti CM, Johnson JE. High prevalence of positive antibodies to *Legionella pneumophila* among patients. *Chest*, 1991; 100: 663-6.
166. Morimoto T. Serum antibodies to *Legionella pneumophila* by indirect immunofluorescent antibody test in 269 hemodialysis patients and 353 healthy subjects. *Rinsho Byori*, 1991; 31: 71-5.
167. Katz SK, Hakki A, Schwartz AB, Katz SM. Lack of antibodies to *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in hemodialysis patients. *Scand J Urol Nephrol*. 1989; 23: 151-2.
168. Bettelheim KA, Metcalfe RV, Sillars H. Levels of antibody against *Legionella pneumophila* serotype 1 in healthy populations in five areas in New Zealand. *J Clin Microbiol*. 1982; 16: 555-7.
169. Bernat A, Garrigos E, Martin J, Moll R, Perez A. Legionnaires' disease outbreak in a hemodialysis unit. (Letter). *Nephrol Dial Transplant*. 1994; 9: 217-8.
170. Thacker WL, Benson RF, Staneck JL, et al. *Legionella cincinnatiensis* sp. nov. isolated from a patient with pneumonia. *J Clin Microbiol*. 1988;26:418-20.
171. Vural T, Çolak D, Ögünç D, et al. Legionellosis in immunosuppressed Patients. In book of abstracts of the 12 th meeting of the European Working Group on Legionella Infections. Lisbon, 1997; 34.

172. Falkenhagen D, Brown GS, Thomanek U, et al. Behaviour of white blood cells and the complement system. *Nephrol Dial Transplant*. 1993; 8(Suppl 2): 8-14.
173. Shin J, Matsuo M, Shinko S, et al. A study on hemodialysis leukopenia using various dialyzers. *J Dial*. 1980; 4: 51-62.
174. Himmelfarb J, McMonagle E, Holbrook D, Tolth C. Soluble complement receptor 1 inhibits both complement and granulocyte activation during ex vivo hemodialysis. *J Lab Clin Med*. 1995; 126: 392-400.
175. Himmelfarb J, Zaoui P, Hakim R. Modulation of granulocyte LAM-1 and MAC-1 during dialysis-a prospective, randomized controlled trial. *Kidney Int*. 1992; 41: 388-95.
176. Himmelfarb J, Ault KA, Holbrook D, Leeber DA, Hakim RM. Intradialytic granulocyte reactive oxygen species production: a prospective, crossover trial. *J Am Soc Nephrol*. 1993; 4: 178-86.
177. Himmelfarb J, Lazarus JM, Hakim R. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis*. 1991; 17: 271-6.
178. Töre O. Transplantlı Hastalarda Bakteriyel İnfeksiyonlar. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Kongre Program ve Özet Kitabı (Eds: Tekeli E, Wilke A) 'nda, Antalya, 6-10 Ekim 1997, 161-5.
179. Lo Presti F, Riftard S, Vandenesch F, et al. The first clinical isolate of *Legionella parisiensis*, from a liver transplant patient with pneumonia. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1706-9.
180. Harrington RD, Woolfrey AE, Bowden R, McDowell MG, Hackman RC. Legionellosis in a bone marrow transplant center. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 18: 361-8.
181. Singh N, Gayowski T, Wagener M, Marino IR, Yu VL. Pulmonary infections in liver transplant recipients receiving tacrolimus. Changing pattern of microbial etiologies. *Transplantation*. 1996; 61: 396-401.

182. Ögünç G, Özdemir T, Vural T, Süleymanlar G, Akaydın M, Karpuzoğlu T. Böbrek transplantasyonu sonrası gelişen lejyoner hastalığı. Mikrobiyol Bült.1993; 27: 137-42.

183. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 86-124.